

中山醫學大學生化暨生物科技研究所碩士論文
**Master Thesis, Institute of Biochemistry and
Biotechnology, Chung Shan Medical University**

樗葉花椒醇抑制 TPA 所誘導的發炎
及促癌作用之研究

**Inhibitory effect of Ailanthoidol on TPA induced
inflammation and tumor promotion**

指導教授:曾翠華 教授 【Tsui-Hwa Tseng】

研究生:邱雅惠 撰【Yea-Huey Chiou】

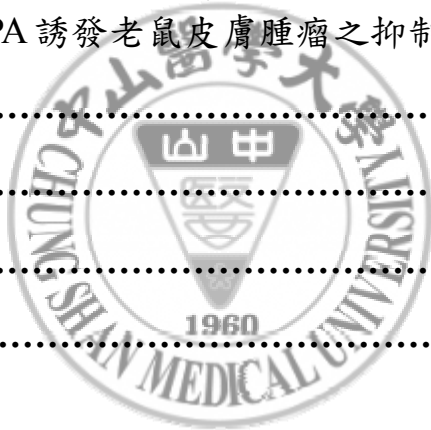
中華民國九十四年七月

目 錄

頁次

縮 寫 表.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
壹、緒論.....	4
一. Ailanthoidol 之背景介紹.....	5
二. Ailanthoidol 之結構研究概要.....	5
三 食茱萸(<i>Zanthoxylum ailanthoides</i>)的之背景.....	6
四. Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)與 Myeloperoxidase (MPO).....	7
五 B[a]P(Benzo[a]pyrene)的導致腫瘤的機制.....	7
六.TPA(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate)的誘發腫瘤的機制.....	8
七.COX-2(Cyclooxygenase-2)與癌症的關係.....	9
八.iNOS(Inducible nitric oxide synthase)與癌症的關係.....	10
九.ODC(ornithine decarboxylase)的酵素與腫瘤的生長關係.....	11
十.自由基與疾病的關係.....	11
十一.癌症的促進作用與過程.....	12
貳、研究背景與動機.....	14
參、材料與方法	
一、實驗藥品與使用儀器.....	15
(一) 實驗試劑.....	15
二、實驗方法.....	16
(一) Ailanthoidol 的合成與分析.....	16
(二) 自由基捕捉測定(Determination of free radical-quenching).....	16
(三) 動物來源(Source Of Animals).....	17
(四) 老鼠耳朵水腫試驗(Edema Of Mouse Ear).....	17
(五) 過氧化氫.....	18
(六) MPO.....	20
(七) 鳥胺酸脫羧酶(Ornithine decarboxylase;ODC)活性試驗.....	21

(八)老鼠皮膚形態改變試驗(Mouse change shape of skin).....	23
(九)老鼠皮膚腫瘤研究(Mouse tumor analysis of skin).....	26
(十)西方點墨法(Western blotting).....	27
(十一)分析統計(Statistics on alysis).....	29
肆、結果	30
一. Ailanthoidol 對自由基捕捉能力之測定.....	30
二. Ailanthoidol 對 TPA 誘發老鼠耳朵水腫之抑制作用.....	30
三. Ailanthoidol 對 TPA 誘發老鼠背部皮膚增生之抑制作用.....	30
四. Ailanthoidol 對 TPA 誘發老鼠背部上皮 H ₂ O ₂ 之抑制作用.....	31
五. Ailanthoidol 對 TPA 誘發老鼠背部上皮 MPO 之抑制作用.....	31
六. Ailanthoidol 對 TPA 誘發老鼠皮膚 COX-2 與 iNOS 蛋白質表現..	32
七. Ailanthoidol 對 TPA 誘發老鼠背部上皮 ODC 活性之抑制作用...	32
八. Ailanthoidol 對 TPA 誘發老鼠皮膚腫瘤之抑制作用.....	32
伍、討論	34
陸、圖表	36
陸、參考文獻	52
柒、附圖(表)	63

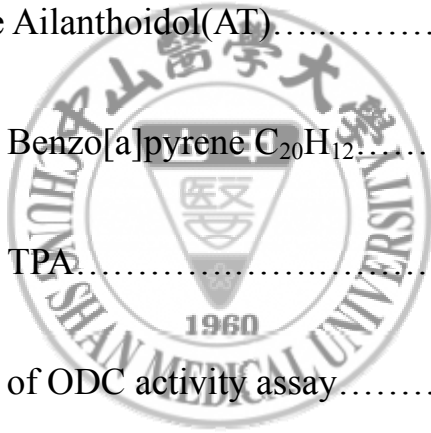


圖表目錄

表一.	Inhibitory effect of AT on TPA-induced edema of mouse ear....	36
表二.	Inhibitory effect of AT on TPA-induced morphological changes in epidermis.....	37
表三.	Inhibitory effect of AT on the formation of H ₂ O ₂ in mouse epidermis treated with TPA.....	38
表四.	Inhibitory effect of AT on the MPO activity in mouse skin treated with TPA.....	39
圖一.	Effect of AT on DPPH bleaching.....	40
圖二.	Inhibitory effect of Ailanthoidol on TPA-induced epidermal hyperplasia in mice.....	41
圖三.	Effect of AT on the expression of epidermis COX-2 after TPA administration in mouse.....	45
圖四.	Effect of Ailanthoidol on the expression of epidermis iNOS after TPA administration In mouse.....	46
圖五.	Inhibitory effect of AT on TPA-induced epidermal ornithine decarboxylase activity.....	47
圖六.	Inhibitory effect of AT on TPA-Induced tumor promotion in mouse skin.....	48
圖七.	Inhibitory effect of AT on TPA-Induced tumor promotion in mouse skin.....	49
圖八.	Inhibitory effect of AT on TPA-induced tumor promotion with B[a]P initiation in mouse skin.....	50
圖九.	Inhibitory effect of AT on TPA-induced tumor promotion in mouse skin.....	51

附圖目錄

圖一.	Simplified model of multi-stage carcinogenesis.....	63
圖二.	食茱萸及木質莖部.....	64
圖三.	Structure of the Lignan and neolignan.....	65
圖四.	Structure of the Ailanthoidol(AT).....	66
圖五.	Structure of the Benzo[a]pyrene C ₂₀ H ₁₂	67
圖六.	Structure of the TPA.....	68
圖七.	The bio-reactor of ODC activity assay.....	69



誌 謝

研究學問的用心與堅持是曾翠華老師給我們的訓練，論文得以順利完成感謝恩師的包容與諄諄教誨，以及王朝鐘所長不吝的指正教導，在實驗室的這兩年受到學長姐的照顧將銘於心中，特別感謝高而仕學長常給我知識上教導與心靈打氣，可敬的應化系胡超群老師常給予我很多寶貴的意見，還有我最可愛又辛苦的智炫學弟及星君學長、維駿學長、宥芳學姐、俊人同學及患難的智英同學的提攜照顧，一切將都是求學期間最美好的回憶。

最後僅將此論文獻給我最懷念的父親，及我的家人和我寶貝兒子及我的朋友。

※特別感謝彰師大李衍彰教授在學術研究的指正及提供合成藥物用品，使得實驗得以順利進行。

縮寫表

<u>縮寫</u>	<u>全名</u>
ODC	Ornithine decarboxylase
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
MPO	Myeloperoxidase
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
B[a]P	Benzo[a]pyrene
COX-2	Cyclooxygenase-2
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
NF-κB	Nuclear factor κ B
AT	Ailanthoidol
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl



中文摘要

我國傳統民間常用草藥中往往具有抗氧化且安全無毒的特性，例如：類黃酮、胡蘿蔔素及天然多酚類。許多天然中草藥植物具有降低發炎與抑制腫瘤生長的成效。具有生物藥理活性天然有機全合成產物 Ailanthoidol(AT)在 1983 年首度由 Ishii 等人，由皮部分分離(1)得到。屬於 neolignan family 之一(2)，過去的研究已知像 Lignans、neolignans 及 nor-neolignans 類的結構式具有多樣化的生物活性，例如抗癌、抗增生、抗氧化、抗發炎、及癌症預防等作用。在本實驗中發現 AT 具捕捉自由基的能力。研究證實具有抗氧化或抗發炎的藥物往往也具有抑制 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)的促癌作用(3-6)，實驗欲進一步評估 AT 對於抗發炎及抑癌促進作用的情形。首先在 TPA 誘發老鼠耳朵水腫作用下加入不同濃度 AT (0.5 mM、1.0 mM 及 2.5 mM)分別能抑制有 45%、68%、96% 的效果，另外以老鼠背部皮膚癌指標酵素 ornithine decarboxylase (ODC) 之活性結果顯示 81.5%、85.2%、91.3% 的抑制作用，在 COX-2 與 iNOS 發炎反應性蛋白質表現上也有相類似的效果。相同的在 H₂O₂ 及 MPO 分別也顯示有 83%、90%、96% 及 58%、61%、97% 的抑制效果，此外 AT 對於 TPA 誘導皮膚形態改變抑制試驗中作病理切片觀察，預先處理 AT 可有效地降低因 TPA 所造成的老鼠上皮細胞增生。另外前處理不同濃度的 AT 在老鼠皮膚腫瘤二階段癌化模式實驗加入癌細胞生長起始劑 0.2 mol Benzo[a]pyrene (B[a]P)及癌細胞生長促進劑，TPA(0.5 nmol)證實，AT 具有預防細胞癌化的作用，進一步可能具有抑制腫瘤細胞生長之功能，證實 AT 的確具有抑制 TPA 所誘導之發炎及癌促進的作用。

Abstract

Ailanthoidol (AT), a member of neolignan, has been obtained from the stem woods of *Zanthoxylum ailanthoides* (1,2). Evidence demonstrated that neolignan and lignan exhibit a broad range of biological activities such as antiproliferation, antiviral, antioxidant, cancer preventative and anti-inflammatory. In the preliminary study, AT showed an effective antioxidant property. Further investigations showed that the topical application of AT (0.5, 1.0 and 2.5 mM) inhibited TPA-induced the incidence of edema in mouse ear to 45, 68 and 96%, respectively. The topical application of AT inhibited TPA (5 nmol)-caused induction of epidermal ornithine decarboxylase (ODC) and myeloperoxidase (MPO) activity. The same doses of AT also reduced the formation of hydrogen peroxide in the mouse skin to an inhibition of 83, 90 and 96%, respectively. In addition, biological analysis revealed the same AT inhibited inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression. Pre-application of AT also afforded significant protection against histopathological changes in TPA-induced hyperplasia on mouse skin. To investigate the topical application of AT with TPA three times one week for 24 weeks to mice previously treated with Benzo[a]pyrene (B[a]P) inhibited the number of tumors per mouse. Finally, our results indicate that AT can inhibit TPA-induced inflammation and tumor promotion.

壹. 緒論

台灣衛生署近年來公布國人十大死因排行，惡性腫瘤連續廿二年蟬聯首位，平均約十五分鐘就奪走一條生命，在許多先進國家，更是每三個人之中就有一個人因罹患癌症而死亡。成為各國的十大死因之一，因此癌症的預防與治療已經成為國家的醫療及生物基礎研究單位一個重要的研究主題，在我們生活的環境中充滿了各式各樣的致癌物質，也存在許多天然的抑癌物質。最近十年來，科學家們除了在治療癌症上繼續投入研究外，更積極開發研究預防癌症的天然物及中草藥。所謂的癌症化學預防藥劑（cancer chemopreventive agents）的類別大約可分為：維生素 A 酸的衍生物、抗氧化劑、癌化作用酵素之抑制劑、非類固醇性的抗炎劑（某些止痛劑）等，預防人體免於致癌物質之侵犯。然而來自於一些天然的食物，例如：十字花科的蔬菜（如甘藍菜、花椰菜、包心菜等）、蕃茄、綠茶、咖哩等都有研究顯示有不等程度的防癌作用，癌症的形成需要冗長的過程以及多重步驟（附圖一）其中包括：癌症的發生為一多重步驟性的致癌過程 (multistep carcinogenesis), 分成【1】起始期 (initiation phase) 為一快速且不可逆的階段，主要由於細胞內的核酸發生突變所致；【2】促進期 (promotion phase) 是由於一些致癌原作用，造成基因異常所致；【3】進展期 (progression phase) 為癌細胞開始侵犯鄰近正常組織，進一步轉移到相關的組織或器官。因此能有效在任一時期阻斷癌細胞的進行者，皆為我們尋找天然抗癌藥物的最重要目標。根據過去文獻中得知，發炎反應時常會刺激 polyamine metabolisms (7)、arachidonic acid metabolisms (8) 及 oxidative stress (9) 大量分泌與過度活化，以上的發

炎物質皆具有癌促進作用，而發炎反應過程的代謝產物，如活性氧系 (ROS)及前列腺素(PGs)衍生物可做為 pro-inflammatory mediators 及癌促進作用。因此本研究設計以 TPA 誘發老鼠體內發炎及氧化性傷害機制，來觀測 AT 之作用情形，並以 Benzo[a]pyrene 為起始物及 TPA 為促進物這種二段式誘發的皮膚腫瘤模式的試驗，來評估 AT 之抗癌促進作用 (10,11)。

一、 AT 的背景介紹

具有生物藥理活性天然物的有機全合成產物 AT 在 1983 年首次由 Ishii 等由食茱萸 (*Zanthoxylum ailanthoides*) (附圖二)莖皮部分分離得到(1)，食茱萸 (*Zanthoxylum ailanthoides*) 植物早期用在治療像蛇咬傷、筋骨疼痛損傷、病毒感染及感冒等有相當程度的療效，由食茱萸莖部 (12-13) 及 *Sarcomelicope megistophylla* 植物的莖皮中可以分離(2)出多種的有效成份，其中 nor-neolignan 及 phenylpropanoid 兩種成份中可以進一步得到 AT 的成份，近年來在藥用成份有機全合成的發展上可以節省一些萃取中繁瑣的步驟與時間，本研究在 AT 藥物，由國立彰化師範大學化學系暨研究所李衍彰教授實驗室，選擇具有生物藥理活性天然物的有機全合成方法所提供 (14)。

二、 AT 之結構研究概要

AT 為一帶有 2-arylbenzofuran skeleton 的天然物，結構如(附圖四)，廣泛存在於自然界的植物中，屬於 neolignan family 的成員之一的 nor-neolignan，根據研究具有 benzofuran 架構的 Lignan 天然物(15)

(附圖三)皆含有一 2-phenyl-7-methoxy-benzofuran skeleton，不同種類的 Lignans 會有不同的取代基，像 Lignan 這樣的結構式具有相當多樣化的生物活性，如抗癌 (anticancer) (16)、抗增生 (anti-proliferative) (17)、抗病毒 (antiviral) (18)、免疫抑制 (immunosuppressive) (19)、抗血小板 (antiplatelet) (20)、抗氧化 (anti-oxidantive) (21)、殺蟲劑 (insecticidal) (22)、抗發炎 (anti-inflammatory) (23)、抗黴菌 (antifungal) (24)、昆蟲拒食 (antifeedant) (25) 及癌症預防 (cancer preventative) (26)。

三、食茱萸 (*Zanthoxylum ailanthoides*) (附圖二) 之背景介紹

【其他名稱】：刺蔥欖子、越椒、刺江茱、紅刺(27-28)。

【可用部位】：種子及莖部、枝部，嫩芽亦可做為香料用途。

【採集時間】：一年四季。

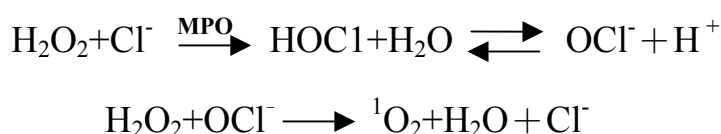
【用途】：根部可用於治療跌打損傷及風濕關節症，果實可做為胃腸用藥。

食茱萸成份最早研究是在 1915 年由藤崎自植物葉部分離到一些精油成分後來許多成份陸續被發現, 1983 年首次由 Ishii 等由食茱萸 (*Zanthoxylum ailanthoides*) 莖皮部分分離得到(1) 食茱萸俗稱刺蔥 (*Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc.) 為芸香科(Rutaceae)花椒屬 (*Zanthoxylum*) 全世界約 100 種, 其中有 9 種分布在台灣(29), 俗稱烏不踏、刺江茱等, 自古以來即為入藥植物, 其根、莖、葉及果實都是具有多用途之中藥材。產地自台灣北部、中部、東部低地及中高地森林中均可發現, 有溫中、止痛、理氣等功效。茱萸葉還可治霍亂, 根

部可以殺蟲。過去研究食茱萸之根皮所分離的幾種化合物中(13)，例如:Quinoline derivative、phenylpropanoid、Lignan(30, 31)、steroid、coumarin 等，皆發現具有治療瘧疾、病毒感染、抑制癌細胞的增生及蛇疾病等的活性。當中以 phenylpropanoid、Lignan 這兩種化合物分離之後富含 AT 的成份(13)。

四、 H₂O₂ (Hydrogen peroxide)與 MPO (Myeloperoxidase)

已知 MPO 酵素本身是一種白血球衍生的血紅蛋白(Heme Protein)是由兩條重鏈及輕鏈所組成，分子量為 140 KD 與血管發炎性、冠狀動脈硬化有關，並與 EPO(eosinophil peroxidase)及 LPO(lactoperoxidase)同為一種哺乳類動物的氧化酵素，並儲存於嗜中性白血球(Neutrophils)的顆粒中，同時具有活化異種物質形成具基因毒性的不穩定中間產物的能力，所伴隨著產生的 HOCl、·OH 等。而 MPO 必需透過 H₂O₂ 需氧殺菌的氧代謝活性產物，能有效地進行殺菌，當中性白細胞吞噬細菌後，氧耗量會大量的增加，此時 H₂O₂ 生成增加(32)，但 O₂ 和 H₂O₂ 的殺菌作用並不太強，使 O₂ 還原為超氧陰離子 O₂⁻。使得活性氧化物質增加而引起的氧化性壓力，在 MPO 和鹵化物的作用下可產生羥自由基 (·OH) 和次氯酸 (HOCl)，具有強烈的殺菌作用。



五、 B[a]P (Benzo[a]pyrene) (附圖五)

B[a]P 是一種常見且與環境相關的致癌物，特別是對皮膚和肺的致癌

力最強(33)，結構上屬於多環芳香烴（ Polynuclear Aromatic Hydrocarbons；PAHs），可由煙焦污染環境中分離到，燃料油不完全燃燒是生成的主因，因其廣泛分佈於環境中，因此也經常存在於各類食品中。B[a]P 常被使用於動物模式中，當作癌起始劑（initiator），通常於老鼠皮膚上給予 B[a]P 再併用 TPA 當作癌促進劑（promoter），則可誘發皮膚癌的形成。

六、 TPA（12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate）（附圖六）

TPA是從*Croton Tiglium* 的種子提煉的巴荳油中萃取出的一種 phorbol ester，在典型的二段式皮膚腫瘤誘發模式實驗中，phorbol ester可以促使已被 initiation 的皮膚癌化提前，並使腫瘤數目增加（34-36）。因此，此模式常被用於探討一些化學致癌物質導致腫瘤之各種生化及細胞分子生物學上之變化（37-39）；TPA本身是很強的細胞癌化促進劑，在動物皮膚試驗及細胞實驗中均證實 TPA 之所以能夠促進細胞癌化是經由活化細胞內的訊息傳導路徑，如蛋白激酶之活化(PKC)、致癌基因c-Jun/c-fos之誘導與活化細胞增生的相關酵素如MAPK、JNK等(40)。本身不具致癌力，但可以促進化學致癌物的致癌作用，它在促進皮膚癌方面的作用(41)方式主要包括：

- 【一】誘發上皮中鳥胺酸脫羧酶（Ornithine decarboxylase；ODC）活性及基因之大量表現；
- 【二】誘發上皮中第二型之環氧化酵素（Cyclooxygenase-2；COX-2）活性及基因之大量表現；
- 【三】誘發上皮細胞中之NF- κ B活化（42-45）；

【四】連續多次處理 TPA 的情況之下，會誘發上皮的增殖肥大 (Hyperplasia)；

【五】TPA 在不同細胞中具引發活性氧 (active oxygen species) 的能力；

【六】可能具引起氧化性的 DNA base 損傷 (46)。

七、COX-2 (Cyclooxygenase-2)

在發炎反應的過程中，環氧化酵素 (Cyclooxygenase; COX) 是將 Arachidonic acid (AA) 轉換成 Prostaglandins (PGs) 的 key enzyme。PGs 為一群具有二十個碳的類花生酸 (Eicosanoid)，可被人體各器官合成，作為 autocrine 或 paracrine，除了在發炎反應中扮演重要角色外，它參與的功能尚有血液凝集、排卵及分娩過程、骨質代謝、神經的生長及發育、傷口的癒合、腎功能、血管的收縮及免疫反應等。Cyclooxygenase 有兩種異構物 (isoform)。即 COX-1 和 COX-2 (47)，COX-1 在所有組織均有一定基本量的表現特別是胃黏膜及腎臟，催化產生前列腺素以維持正常的生理運作，例如前列腺素 E (PGE) 在胃中可保護胃黏膜不受胃酸侵蝕，在腎臟中維持正常的腎血流不致於缺血受損等，因此 COX-1 被稱為是「house-keeping COX」，提供體內平衡調節 (homeostatic regulation) 之用。正常狀態下 COX-2 在細胞中的含量微乎其微而 COX-2 是在組織損傷過程中經由誘導產生，並以 Arachidonic acid 為受體生成前列腺素 (PGs) 以引起疼痛和發炎 (48)，目前已有研究顯示，TPA 引起發炎反應過程中 COX-2 會大量表現 (49,50)。COX-2 的代謝產物主要有四種，分別為 Prostaglandin E2

(PGE₂)、Prostaglandin F₂(PGF₂)、Thromboxane A 及 Prostacyclin，其中以 PGE₂ 與發炎反應最為相關(51)，而被視為Pro-inflammatory mediators。在許多不同腫瘤細胞中皆發現 COX-2 大量表現，根據這種特性，一些抗發炎抗癌的藥物，其抗炎效果乃是在於抑制COX-2的結果，因此若能抑制COX-2活性或表現將可降低癌症發生的可能。

八、 iNOS (Inducible nitric oxide synthase)

一氧化氮(NO)在發炎反應過程中扮演相當重要的角色(52)。NO生成主要是經由活化一氧化氮合成酵素(NOS)而將細胞內之L-arginine轉變成為L-citrullin及NO和自由基的釋放，細胞內NOS主要分為兩大類；一為結構性NOS(constitutive NOS; cNOS)，另一種為誘導型NOS(inducible NOS; iNOS)。cNOS產生固定量之NO為維持體內正常運作之重要訊息傳遞因子，NO會藉由促使GDP轉變為cGMP進而誘發一連串之生理反應，包括血管擴張、子宮平滑肌鬆弛及抑制血小板凝集等作用，是一個重要的神經傳遞物質(neurotransmitter)及細胞毒性物質(53)。在之前研究中已指出慢性感染及發炎過程是造成癌症的危險因子之一，當組織受傷時，會產生NO及其他自由基，進而使細胞及DNA受損，並促使腫瘤的形成(54)然而，iNOS所誘導出之大量NO自由基則會造成細胞的傷害與血管過度的舒張最後造成嚴重的發炎反應以及併發症，如敗血性休克、中風、DNA受損、突變所造成細胞的癌化等。另一方面它能让吞噬細胞具有殺死癌細胞及細菌的能力、使血管放鬆、調控血壓，在哺乳動物中，主要是由L-精胺酸(L-arginine)在一氧化氮合成酶(Nitric oxide synthase; NOS)

的催化下，經過一中間產物轉換成L-西瓜胺酸（L-citrulline）和一氧化氮（NO）。NOS有神經性（type I；nNOS）、誘發性（type II；iNOS）和內皮性（type III；eNOS）等三種，是依照最初發現的地方而命名（各在神經突觸、巨噬細胞和血管內皮）。其中iNOS在正常情況下是不被表現出來，當有內生性（endogenous）或外生性（exogenous）物質的刺激產生如發炎反應、敗血症、阿茲罕默症（Alzheimer's disease）或肺炎等異常狀態時才會大量的被表達（55-57）。在先前研究中也已發現TPA造成發炎及癌促進作用時，亦會伴隨著iNOS大量表現（58）。

九、 ODC（ornithine decarboxylase）

ODC 是 polyamine 代謝的 key enzyme 也是第一步驟，此酵素在細胞增殖（proliferation）的調節及腫瘤之生長扮演一個重要角色（59）。有研究顯示老鼠表皮 ODC 活性被大量活化時與表皮細胞不正常之增生與轉形（transformation）有正相關性（60,61），且已有報導指出在一些轉形的細胞中可能發現 ODC 的基因被大量的表達出來（62）因此利用尋找 ODC 的抑制劑來達到阻斷或預防癌症的發生亦被當成重要的指標之一（63）。

十、 自由基與疾病之關係

許多研究指出自由基、活性氧在許多疾病（如皮膚老化、腫瘤、心臟血管病變）的發展上扮演極重要的角色。人體在正常代謝過程中會產生自由基與活性氧，所謂自由基是指帶有一個或多個不成對電子

不穩定的物種 (species) (64)，活性氧則為人體代謝產生反應活性較基態氧強的含氧物種；而一些外來的物質如藥物、致癌物及生活壓力在體內代謝過程中也會產生自由基與活性氧(activated oxygen)這些物質會進而攻擊細胞膜、細胞組織並危害細胞核內基因物質，再進一步傷害細胞引發病變，甚至死亡。雖然自由基與活性氧會造成生物體細胞的損害，甚至導致死亡，但在正常狀況下，生物體本身具有抗氧化防禦系統，產生抗氧化酵素及抗氧化物(antioxidant)來移除自由基與活性氧，並由修護系統修補所引發的傷害。本研究中用到一種自由基試藥稱DPPH，DPPH是一種脂溶性自由基本身結構上具有穩定的共振，本研究所使用的DPPH在517nm的波長下有特定的吸光值，由於抗氧化劑與DPPH自由基的反應作用，當DPPH的濃度降低時，OD值也會跟相對的下降，所以我們藉由DPPH指數的降低可知抗氧化劑具有好的清除的能力。

十一、 癌化的促進作用與過程

自 1982 年以來癌症便高居台灣十大死亡原因首位，目前增加速度最快的癌症包括攝護腺癌、口腔癌、乳癌、大腸直腸癌和肺癌，癌症的發生與暴露於環境中化學性、物理性及病毒性致癌因子 (carcinogens) 的量有直接的關係，正常細胞必需透過相關的化學物質構成一個起始作用，造成相關的慢性發炎反應，伴隨著發炎性白血球

的浸潤，進一步造成不等程度的細胞異常增生現象，另外在慢性發炎反應的過程即會有許多自由基的產生，其他如病毒也會造成單點基因突變進一步於促進因子的作用，並在高重覆性、大量且多重步驟的條件之下刺激與作用，最後導致細胞的變性(transformation)產生腫瘤細胞，本實驗利用致癌劑 TPA 來誘導細胞進行癌化作用，TPA 本身是很強的細胞癌化促進劑，主要可以透過活化細胞內的訊息傳導路徑，如蛋白激酶之活化 PKC、致癌基因 c-Jun/c-fos 之誘導與活化細胞增生的相關酵素如 MAPK、JNK 等。但癌症的形成過程有些長達數年甚至幾十年的促進作用甚至更長的時間(65)，這些致癌因子會經由基因突變而導致正常細胞癌化一般致癌過程(multistep carcinogenesis)分成【1】起始期 (initiation phase)為一快速且不可逆的階段，主要由於細胞內的核酸發生突變所致；【2】促進期 (promotion phase)是由於一些致癌原作用，造成基因異常所致；【3】進展期 (progression phase)為癌細胞開始侵犯鄰近正常組織，進一步轉移到相關的組織或器官。因此能有效在任一時期阻斷癌細胞的進行者，皆為我們尋找天然抗癌藥物的最重要目標。

貳. 研究動機

今日科學日新月異、醫藥技術不斷的進步，但對於諸多重大疾病如癌症等異常相關疾病，在西方醫學中卻仍然缺乏有效的治療或預防方式。然而在我們中國傳統醫學，對於一些在西方醫學感到相當棘手的疾病確有顯著而神奇的療效。但是中草藥至今仍然無法廣為西方醫學所接受最大的原因就在於無法提出科學化的證據，來證實真正的治療機轉。傳統對於食茱萸 (*Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc) 的有效成份大多是以萃取果實及葉子部分的研究為多，一般都用在治療殺蟲子、止痛、腹瀉、齒痛及抗病毒等(13,14)，1983年由Ishii首度由莖皮萃出一種具有生物活性的成份 AT(1)，我們的研究主題為天然中草藥所含的利用有機全合成的成份 AT，結構上屬 neolignan family 之一，參考過去文獻也指出具有 neolignan 成份物質大多具有抑制血小板、治療蛇咬傷、抗癌、抗氧化及抗發炎的作用 (15)，先前本實驗室發現 AT 具有補捉自由基的能力。於是設計一連串的動物以 TPA 誘導發炎活性反應及二階段皮膚癌動物模式探討 AT 之抗癌活性及其作用機制。

參. 實驗材料與方法

一、化學試劑及使用儀器

(一) 化學試劑

1.購自 Amershan 公司(U.K.)：

DL-[¹⁴C]ornithine hydrochloride (56.0 mCi/mmol)

2.購自 Sigma 化學公司(St. Louis, MO, USA)

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Benzo[a]pyrene (B[a]P)

Dithiothreitol (DTT)

Bovine serum albumin (BSA)

12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)

(二) 儀器

分光光譜儀：UV-Visible Spectrophotometer (HITACHI ; U2000)

閃爍偵檢器：Liquid Scintillation Analyzer (Packard ; 2100TR)

均質機：Homogenizer (EYELA ; MAZELA-Z)

冷凍切片機：Knife Holder (LEICA ; CM3050 S)

冷光螢光影像分析系統與照片品質輸出系統：Luminescent Image

Analyzer & Digital Image Printer (FUJIFILN ; LAS-1000)

冷凍乾燥機：Lypholyzer (Heto ; FD4)

減壓濃縮機：Condensor (BUCHI ; RE111)

高速冷凍桌上型離心機：Centrifuge (HERMLE ; Z323K)

蛋白質電泳槽：Mini Protein II cell (BIO-RAD)

二、實驗方法

(一) AT 的合成與分析

國立彰化師範大學化學系暨研究所李衍彰教授實驗室，選擇具有生物藥理活性天然物的有機全合成產物，利用天然物合成 5-bromo-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde 為架構透過六個步驟形成一長串的序列,總產率高達 48% (15)。

(二) 自由基捕捉測定(Determination of free radical-quenching capacity)

本實驗使用 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基，因其在結構上可產生穩定的共振，所以可在適當的狀態下長時間保存，且其在 517nm 的波長下有獨特的吸光值(66)。隨著 DPPH 濃度的降低，其吸光值(O.D)亦隨之降低，故我們可以藉由 DPPH 當作一個指標來看參考 Shimada 的方法(67)，測定清除 DPPH 自由基的能力，因 DPPH 是較為安定的自由基，實驗上所採用的 DPPH 甲醇溶液為紫羅蘭色 (violet) 在 517 nm 下有強的吸光值，若與試樣結合，將會降低吸光值，由此藉以判斷試樣清除 DPPH 自由基的能力，其吸光值愈低，表示試樣清除 DPPH 自由基的能力愈強 AT 對自由基是否有捕捉的作用。實驗流程如下：

取 2.87ml methanol 加入 30 μ l 10mM DPPH
↓
加入 100 μ l DMSO(solvent control)或不同濃度 AT (0.05、0.1 及 0.2 mM)
↓
置於室溫中 30 min
↓
加入 1ml redistilled water 與 3ml toluene，並充分混合
↓
3000 rpm 離心 10 min
↓
取 upper phase 置於 spectrophotometer，在波長 517nm 下測其最大之吸光值

清除率(scavenging effect %):
〔1-(樣品於517nm之吸光值/對照組於517nm之吸光值)〕x 100%

為了避免誤差，樣品反應後之吸光值再扣掉樣品反應前之吸光值

(三) 動物來源

ICR strain 雌性小白鼠 (約五週大) 購自台大醫學院動物中心，動物飼育在室溫設定 22 \pm 2 $^{\circ}$ C，日夜光照 12 小時交替，使用之飼料為美國 Purina Lab Diet，飲用水 (蒸餾水；經逆滲透處理) 不限制飲用，動物在試驗開始前先經一週之環境適應後，才進行試驗。

(四) 老鼠耳朵水腫試驗

1、動物分組

將小白鼠隨機分為六組，每組六隻，依分組在其右耳上處理藥物，第一組為控制組，預先處理 20 μ l acetone (solvent control)，五分鐘後再給予 20 μ l acetone；第二組預先處理 20 μ l acetone，五分鐘後再給予 20 μ l TPA(25 μ M；final conc. 0.5 nmol)；第三組預先處理 20 μ l

AT (2.5 mM)，五分鐘後再給予 20 μ l acetone；第四組至第六組預先處理 20 μ l 不同濃度之 AT (0.5、1.0 及 2.5 mM)，五分鐘後再給予 20 μ l TPA。

分組藥物處理

處理方式 組別	預先處理	5 分鐘後處理
Group 1	20 μ l Acetone	20 μ l Acetone
Group 2.	20 μ l Acetone	20 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 3.	20 μ l AT (2.5 mM)	20 μ l Acetone
Group 4.	20 μ l AT (0.5 mM)	20 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 5.	20 μ l AT (1.0 mM)	20 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 6.	20 μ l AT (2.5 mM)	20 μ l TPA (0.5 nmol)

2、試驗方法

本實驗主要參考 Huang 等方法 (68) 進一步修飾而成，在小白鼠的右耳以上述分組方式給予藥物塗抹，塗抹完畢 5 小時後，將老鼠斷頸犧牲，接著將右耳處理藥物部位用打洞機取直徑約 6mm 的切割部分，稱重且紀錄，結果以 Mean \pm SD 表示，評估 AT 對 TPA 引起老鼠耳朵發炎水腫之抑制情形。

(五) 過氧化氫(hydrogen peroxide, H₂O₂)的測定(69,70)

1、動物分組

將小白鼠隨機分成六組，每組六隻，剃除背部的毛髮之後再將藥物塗抹於背部，各組處理為：第一組為控制組，預先處理 200 μ l acetone (solvent control)，五分鐘後再給予 200 μ l acetone；第二組預先處理 200 μ l acetone，五分鐘後再給予 200 μ l TPA (25 μ M；final conc. 5 nmol)；第三組預先處理 200 μ l AT (2.5mM)，五分鐘後再給予 200 μ l acetone；第四組至第六組預先處理 200 μ l 不同濃度之 AT (0.5、1.0 及 2.5 mM)，五分鐘後再給予 200 μ l TPA。在加藥後的第 20 個小時將老鼠犧牲，在老鼠斷頸犧牲之前 1 個小時，再次處理藥物各組給藥方式如下表：

分組藥物處理

處理方式 組別	預先處理	5 分鐘後處理	第 20 小時犧牲 前 1 小時處理
Group 1	200 μ l Acetone	200 μ l Acetone	200 μ l Acetone+ 200 μ l Acetone
Group 2.	200 μ l Acetone	200 μ l TPA (0.5 nmol)	200 μ l Acetone+ 200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 3.	200 μ l AT (2.5 mM)	200 μ l Acetone	200 μ l AT (2.5 mM)+ 200 μ l Acetone
Group 4.	200 μ l AT (0.5 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)	200 μ l AT (0.5 mM)+ 200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 5.	200 μ l AT (1.0 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)	200 μ l AT (1.0 mM)+ 200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 6.	200 μ l AT (2.5 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)	200 μ l AT (2.5 mM)+ 200 μ l TPA (0.5 nmol)

2、H₂O₂ 活性測試實驗步驟

(1) 藥物處理老鼠背部皮膚 20 個小時之後，在老鼠斷頸犧牲之前 1

- 個小時，再次處理藥物後犧牲，隨即剪取直徑 2 公分之皮膚。
- (2) 取下背部皮膚刮取上皮(參考 ODC activity assay)並將組織剪碎，放入 3ml 的 buffer (10 mM sodium azide,溶於 50mM KH_2PO_4)使用 polytron homogenizer 均質化(約 30 秒)。
 - (3) 以 10,000 rpm 離心 20 min 後利用兩層紗布過濾。
 - (4) 取 10 μl 上清液每 ml 加入 990 μl 的 PR(phenol red)/HRPO (horseradish peroxidase)(5mg PR/ml and 10mg HRPO/ml)。
 - (5) 靜置在室溫下 5 分鐘後加入終止液 pH 值 12.5, 1N NaOH 100 μl ，以波長 610 nm 下測定吸光值。

3、 H_2O_2 的標準曲線測試

分別配製 H_2O_2 的標準溶液，0, 1.5630, 3.125, 6.250, 12.5, 25.0, μM (須避光放冰上) 靜置 5 分鐘，以上不同濃度的 H_2O_2 10 μl 加入溶液總量為 990 μl 的 PR (phenol red) / HRPO (horseradish peroxidase) (0.07mM;0.025g/l /PR and 8.5 U/ml 50 $\mu\text{g/ml}$ /HRPO)solution 需溶於 140Mm 的 NaCl, 10mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 5.5mM dextrose, 的溶液中。靜置在室溫下 5 分鐘後加入終止液 pH 值 12.5, 1N NaOH 100 μl ，以波長 610 nm 下測定吸光值。

(六) 髓過氧化酵素(myeloperoxidase,MPO)的測定

1、動物分組

與前面過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)的實驗處理相同。

2、MPO 活性測試實驗(71)步驟

當細胞內遭受氧化壓力及損傷時會產生大量 H_2O_2 ，MPO 也會隨

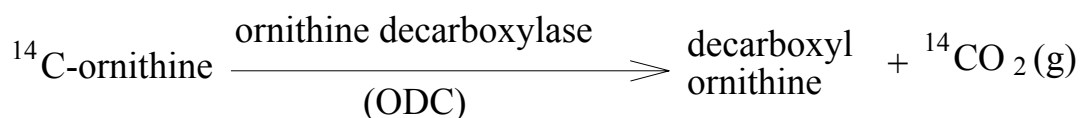
之增加(72)，原理為：



- (1) 藥物處理老鼠背部皮膚 20 個小時之後，在老鼠斷頸犧牲之前 1 個小時，再次處理藥物後，隨即剪取直徑 2 公分之皮膚。
- (2) 取下背部皮膚利用剪刀將皮膚剪碎並加入 3ml 的 buffer(0.5% hexadecyltrimethyl ammonium)使用 polytron homogenizer 4°C 均質化(約 30 秒)。
- (3) 以 10,000 rpm 離心 20 min 後利用兩層紗布過濾後置於冰上。
- (4) 取 2.5mM 的 4-aminoantipyrine-2% phenol solution 1.3ml 和 1.7mM H₂O₂ 1.5ml 混合均勻，取澄清液 0.2ml 加入前一混合液中接著以 510nm 波長的吸收峰測試吸收並紀錄 4 分鐘。
- (5) 一個 unit 的 MPO 表示在 25°C 時，每分鐘水解 1μmol H₂O₂ 的能力，結果以 unit/cm² area of mouse skin 表示之。

(七) 鳥胺酸脫羧酶 (ornithine decarboxylase ; ODC) 活性試驗

ODC 是一種早期皮膚癌的指標，假如 ODC 的濃度偏高，則意謂著有皮膚癌可能性。其測試的原理為：
標誌帶有碳 14 的鳥胺酸透過鳥胺酸脫羧酶的作用使之釋出帶有碳 14 二氧化碳測之其含量。



測定的方法則是以往文獻 (68,73) 修定而成，實驗步驟為：

1、動物分組

將小白鼠隨機分成六組，每組六隻，剃除背部的毛髮之後再將藥物塗抹於背部，各組處理為：第一組為控制組，預先處理 200 μ l acetone (solvent control)，五分鐘後再給予 200 μ l acetone；第二組預先處理 200 μ l acetone，五分鐘後再給予 200 μ l TPA (25 μ M；final conc. 5 nmol)；第三組預先處理 200 μ l AT (2.5mM)，五分鐘後再給予 200 μ l acetone；第四組至第六組預先處理 200 μ l 不同濃度之 AT (0.5、1.0 及 2.5 mM)，五分鐘後再給予 200 μ l TPA。各組給藥方式如下表：

分組藥物處理

處理方式 組別	預先處理	5分鐘後處理
Group 1	200 μ l Acetone	200 μ l Acetone
Group 2.	200 μ l Acetone	200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 3.	200 μ l AT (2.5 mM)	200 μ l Acetone
Group 4.	200 μ l AT (0.5 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 5.	200 μ l AT (1.0 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 6.	200 μ l AT (2.5 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)

2、ODC 活性測試實驗步驟

- (1) 藥物處理老鼠背部皮膚，5 小時後，將老鼠以斷頸犧牲，剪取直徑約 1.5 公分之背部皮膚。

- (2) 取下之皮膚先以 58°C 水浴 30 秒，然後快速置於冰上，刮取上皮(epidermis)組織。
- (3) 將上皮置於 potassium phosphate buffer (50mM, pH7.7, 1ml, 內含有 2mM Dithiothreitol、0.1mM EDTA 及 ornithine 0.25 mM)。
- (4) 在冰上以 polytron tissuizer 進行均質化 (約 30 秒)。
- (5) 以 20,000×g，在 4°C 下離心 20 分鐘。
- (6) 取上清液分成四等份，每等份 50μl，置於 eppendorf 中，一等份作 protien assay，三等份作 ODC activity assay，存於-80°C, overnight。
- (7) 在每一試管內放置 30 μl 上清液，加入 0.1μCi DL-[¹⁴C]ornithine hydrochloride (溶於上述 potassium phosphate buffer 中) 使總體積為 200 μl，試管中以適合 eppendorf 懸吊內含 0.2 ml 2N NaOH (eppendorf 不可與液面接觸)，而後立刻密封試管口 (以上步驟均於冰上操作，試管裝置如 (附圖三))。
- (8) 於 37°C 水浴恆溫槽中進行酵素反應，時間為 1 小時，然後用內裝 0.5ml 2M Citric acid 的注射針筒打入反應液中以中止反應，以內裝 0.2 ml NaOH eppendorf 吸收釋出之 CO₂。
- (9) 30 分鐘後，打開反應試管，取出裝 NaOH 之 eppendorf，整個放入輻射計數小瓶(counting vial)中，加入液體閃爍液，以閃爍計數儀計數輻射量(dpm)。
- (10) 計數出之 dpm 轉換成 ¹⁴CO₂ 的莫耳數，測出之 ODC 以 pmol ¹⁴CO₂ evolved/mg protein/h 表示。

(八) 老鼠皮膚形態改變試驗

1、動物分組

將小白鼠隨機分為六組，每組六隻，藥物處理前兩天，以電動除毛刀剃除老鼠背部毛髮，以利藥物吸收。依分組在老鼠背部處理藥物，第一組為控制組，預先處理 200 μ l acetone (solvent control)，五分鐘後再給予 200 μ l acetone；第二組預先處理 200 μ l acetone，五分鐘後再給予 200 μ l TPA (25 μ M；final conc. 5 nmol)；第三組預先處理 200 μ l AT (2.5 mM)，五分鐘後再給予 200 μ l acetone；第四組至第六組預先處理 200 μ l 不同濃度之 AT (0.5、1.0 及 2.5 mM)，五分鐘後再給予 200 μ l TPA。各組給藥方式如下表：

分組藥物處理

處理方式 組別	預先處理	5 分鐘後處理
Group 1	200 μ l Acetone	200 μ l Acetone
Group 2.	200 μ l Acetone	200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 3.	200 μ l AT (2.5 mM)	200 μ l Acetone
Group 4.	200 μ l AT (0.5 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 5.	200 μ l AT (1.0 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)
Group 6.	200 μ l AT (2.5 mM)	200 μ l TPA (0.5 nmol)

2、試驗方法

本實驗主要參考 Huang (68) 等人之方法進一步修飾而成，在小

白鼠的背部以上述分組方式給予藥物塗抹，一天兩次，連續七天，在最後一次給藥後 18 小時後將老鼠斷頸犧牲，取下約 2cm × 2cm 的背部皮膚，立即浸泡於 10% neutral buffered formalin 中固定，然後以 hematoxylin and eosin 染色 (H&E stain)，其步驟如下：

- (1) 脫臘後，以紫蘇木 (hematoxylin) 溶液染 2~15 分鐘 (時間長短依紫蘇木溶液之不同而定)。
- (2) 以水浸洗。
- (3) 以 0.5% 鹽酸溶液行分辨染色色度，約 1~5 秒。
- (4) 浸入氫水 (水 1000 ml 中滴入氫水 2 滴) 至組織呈現藍色，約需數秒。
- (5) 於流水中清洗，至少 15 分鐘。
- (6) 染以 0.5% 伊紅 Y 溶液，數秒至 2 分鐘。
- (7) 依次通過 80%、90%、95% 酒精。
- (8) 移入 100% 酒精：二甲苯-100%(1:1) 溶液 30 秒。
- (9) 移入二甲苯：木餾油(4:1) 及二甲苯(I)、二甲苯(II) 溶液各 30 秒。
- (10) 以二甲苯使之透明。
- (11) 封蓋。

本實驗的結果表示方法共分 4 部份；

(1) 上皮層厚度 (Epidermal thickness)：每一片切片中隨機選取 5 處來計算並平均，結果以 mean ±SE 來表示。

(2) 發炎細胞浸潤 (Leukocyte infiltration) 情形：乃是藉著與溶劑控制組 (acetone control) 比較上皮中單核發炎細胞 (mononuclear

inflammation cells)的 diffuse infiltration，結果以輕微(slight,+)、中度(moderate,++)及重度(severe,+++)來表示。

(3) 角化現象 (Hyperkeratosis)：同上以輕微(slight,+)、中度(moderate,++)及重度(severe,+++)來表示。

本實驗使用顯微鏡放大 40 倍(物鏡×目鏡)來觀察。

(九) 老鼠皮膚腫瘤研究

1、動物分組

根據二段式皮膚腫瘤誘發模式實驗，將小白鼠隨機分為六組，每組六隻，每隻都以電動除毛刀剃去背部的毛髮，並在背部塗抹藥物以觀察腫瘤的生長。依分組在背部處理藥物，第一組為溶劑控制組，僅給予 200 μ l acetone(solvent control)；第二組處理 initiator: B[a]P 200 μ l (1mM; final conc. 0.2 μ mol 溶於 Acetone 中)，第二週至第二十四週僅給予 acetone 僅第十二週給藥一次，之後；第三組在第十二週處理 initiator(B[a]P)一次外，第二週至第二十四週給予 promoter: TPA 200 μ l (25 μ M; final conc. 5 nmol)，每週三次；第四組至第六組第十二週先處理 B[a]P 後，第二週至第二十四週在每次給予 TPA 前五分鐘，預先處理 200 μ l 不同濃度之 AT (0.5、1.0 及 2.5 mM)，每週三次。表：

分組藥物處理

處理方式 組別	第二週~第二十四週/(每週3次)	第十二週
Group 1	Acetone(先), Acetone + Acetone(後)	Acetone

Group 2.	Acetone(先), Acetone + Acetone(後)	200μl B[a]P (0.2 mol)
Group 3.	200μl Acetone(先) Acetone + 200μl TPA (0.5 nmol) (後)	200μl B[a]P (0.2 mol)
Group 4.	200 μl AT (0.5 mM) (先)+ 200μl TPA (0.5 nmol) (後)	200μl B[a]P (0.2 mol)
Group 5.	200 μl AT (1.0 mM) (先)+ 200 μl TPA (0.5 nmol) (後)	200μl B[a]P (0.2 mol)
Group 6.	200 μl AT (2.5 mM) (先)+ 200 μl TPA (0.5 nmol) (後)	200μl B[a]P (0.2 mol)

2. 測驗方法

本實驗參照 Huang (74) 等的方法來測量，每週觀察一次老鼠皮膚上腫瘤生長的情形，以量尺在固定面積內(面積計算公式： $A=\pi/6\times D1\times D2$)量取直徑大於 1mm 的腫瘤才可列入計算並紀錄下來，共紀錄二十四週，結果以 tumors/mouse 及 percentage/mice with tumors 來表示。

(十) 西方點墨法 (Western blotting)

實驗原理：

利用電流將帶有負電荷之不同分子量的蛋白質分離，並以具專一性之抗體與目標蛋白結合，放大並顯示該蛋白表現的變化情形。

(1) COX-2 與 iNOS：同上述 ODC 活性試驗方法；剃除小白鼠背部毛髮，分組處理 TPA 及不同濃度的 Ailanthoidol，經 5 小時後，將老鼠犧牲取下背部皮膚刮取上皮組織，置於 potassium phosphate buffer 中，均質化後以 20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C 下離心 30 分鐘，取其上清液置於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱備用。

2、蛋白質定量

利用不同濃度之 BSA (Bovin Serum Albumin) 做為標準品，與 comassie blue 於室溫中反應 1 分鐘，置於分光光度計中以波長 595 nm 測其吸光值，先畫出標準曲線，再將樣品經適當稀釋後，測其吸光值並帶入標準曲線中換算出各樣品的蛋白質濃度。

3、SDS-PAGE

取定量後之樣品 80 μ g，加入適量的 sample buffer (2ml 0.5M Tris-HCl(pH=6.8) 、 1.6ml Glycerol 、 3.2ml 10% SDS 、 0.8ml 2- β -mercaptoethanol、0.4ml 0.5% bromophenol blue)混合均勻，經 spin down 後以 95°C 加熱 3~5 分鐘使蛋白質 denature，加熱結束後迅速放入冰中冷卻，避免蛋白質 renature，隨後將樣品 loading 至 SDS 膠片中 (COX-2 及 iNOS 使用 8% SDS；connexin 使用 12% SDS)，進行電泳。

4、轉漬(Transfer)

待電泳結束後，切除已分層之蛋白質膠片的 stacking gel，然後依序將海綿、濾紙、膠片、Nitrocellular membrane、濾紙、海綿放置於 transfer 用之夾板中，並置入轉漬槽中，以 100 伏特轉漬 1~1.5 小時。

5、Immunoblot

Transfer 完之 NC membrane 先以 Ponceau S 染色並剪下目標蛋白分子之 NC membrane，經數次 wash 後以 5% 脫脂牛奶 (溶於 washing buffer：PBS buffer with 0.5% tween-20) 於室溫下反應 1~2 小時，再經數次 wash，加入一級抗體置於 4°C 冰箱反應 overnight。次日 wash 5 次後，再依實驗不同加入 Horseradish peroxidase conjugated coated

anti-mouse/anti-rabbit antibody 於室溫下反應 60 分鐘，wash 5 次後加入 ECL plus chemiluminescence detection reagent 反應 1 分鐘，以 FUJIFILM LAS-1000 PLUS 定量分析。

(十一) 分析統計

各項活體 (*in vivo*) 實驗每組皆以六隻小白鼠 ($n=6$)，以 Student's t-test 統計分析，於 $p<0.05$ 以下表示為有意義的差異。



肆. 結果

一. AT 對自由基捕捉能力之測定

根據 DPPH test 的測定結果，顯示 AT 對自由基之捕捉作用，具有劑量依存性關係，AT 在 0.05mM、0.1mM 及 0.2mM 的試驗濃度下，其捕捉能力分別清除數值為 64%($P<0.001$)、84%($P<0.001$)及 93%($P<0.001$)隨著劑量不同具有依存關係以上結果證實 AT 具有高度抗氧化的能力。(Figure 1)

二. AT 對 TPA 誘發老鼠耳朵水腫之抑制作用

經 TPA 處理過後之小白鼠耳朵，在短時間內，可誘發使其產生耳朵水腫現象。本試驗以 0.5nmol TPA 處理小白鼠右耳，5 小時後犧牲，取下直徑約 6mm 的耳朵，稱重後發現比控制組重量增加約 70% 以上，而當預先處理 0.5mM、1.0mM 及 2.5mM AT，5 分鐘後再以 0.5nmol TPA 處理，發現耳朵平均重量降低了，分別具有 45%、68% 及 96% 的抑制效果，甚至在預先處理 AT 2.5mM 組中，耳朵重量與控制組相當。這結果顯示 AT 可以有效降低 TPA 引起之發炎反應，且具有劑量依存的效果。(Table 1)

三. AT 對 TPA 所誘發的 H_2O_2 的抑制作用

在給予 TPA(5 nmol)一次之後的 20 個小時，於犧牲動物前 1 小時再給一次藥物處理，使之誘發 H_2O_2 的產生，結果發現在每平方公分皮膚產生 16.56 ± 4.66 的 H_2O_2 是誘發產生的 2.8 倍的作用預先處理 0.5mM、1.0mM、2.5mM 的 AT 的濃度下具有 83%、90%、96% 的

抑制效果。(Table 3)

四. AT 對 TPA 所誘發的 MPO 的抑制作用

與第三項類似的處理方法，在第 20 個小時前後處理 TPA(5 nmol) 測定 MPO 的產生情形，結果發現在每平方公分皮膚產生 344.53 ± 55.05 的 MPO 具有明顯的上昇約誘導 28 倍的作用，預先處理 0.5mM、1.0mM、2.5mM 的 AT 的濃度下具有 58%、61%、97% 的抑制效果。(Table 4)

五. AT 對 TPA 誘發老鼠背部皮膚增生之抑制作用

表皮細胞的厚度與層數在成熟的老鼠中應是維持一恆定狀態，若有不正常增生時，則會造成此恆定狀態被破壞，造成表皮細胞層數與厚度增加並伴隨著角化現象 (Hyperkeratosis) 的產生 (75)，實驗時使用 TPA(5 nmol) 引起輕度的形態改變，並用 AT 前處理後的組別來作觀察與比較。結果以上皮層厚度 (Epidermal Thickness)、發炎細胞浸潤 (Leukocyte Infiltration) 及角化現象 (Hyperkeratosis) 等三部份來表示。在上皮層厚度中，塗抹 TPA 七天後比不處理 TPA 者增厚為約 2.8 倍，當處理了不同濃度之 AT (0.5mM、1.0mM 及 2.5mM) 之後，這種增厚的現象隨著濃度的上升而有恢復的現象；在發炎細胞浸潤方面與角化現象，塗抹 TPA 的組別會增加其嚴重性，而在預先處理 AT 的組別中，皆能看出水腫及發炎反應有減輕的現象；至於在細胞增生與異生情形，結果發現在我們所處理 AT 的三種 0.5mM、1.0mM 及 2.5mM 劑量中都有相對抑制程度的作用。(Table 2. 及 Figure 2)

六.AT 對 TPA 誘發老鼠皮膚 COX-2 與 iNOS 蛋白質表現之抑制作用

由於 TPA 會誘發老鼠皮膚發炎反應，因此本實驗進一步針 COX-2 及 iNOS 兩種與發炎反應有關之蛋白表現，由 Figure. 3、Figure. 4 發現，老鼠皮膚在 TPA(5 nmol)處理 5 小時下，確實能誘導與 iNOS 蛋白質的表現，在預先塗抹 200 μ l AT (0.5mM、1.0mM 及 2.5mM) 後結果發現具有抑制 COX-2 發炎性蛋白 32 % 77% 及 89% 的作用，相對的 iNOS 抑制了，21 % 81% 及 100% 蛋白質的表現，因此 AT 可有效抑制發炎性蛋白質 COX-2 及 iNOS 的表現量且具有劑量依存的現象。

七.AT 對 TPA 誘發老鼠背部上皮 ODC 活性之抑制作用

發炎時會產生大量之 eicosanoid 的代謝產物，其產物如 reactive oxygen species (ROS)與 prostaglandins，而這些物質可活化 ornithine decarboxylase (ODC)，此酵素為 polyamine biosynthesis 的調控酵素，是 tumor promotion 的指標之一，這些物質或可促進增生訊息路徑且具有 tumor promotion 之作用，為進一步確定 AT 對於發炎反應的效果，本試驗預先處理 0.5mM、1.0mM 及 2.5mM AT 後再以 TPA 200 μ l TPA (25 μ M；final conc. 5 nmol) 處理 5 小時，取下皮膚後以 DL-[¹⁴C]ornithine hydrochloride 為受質偵測 ODC 之活性，TPA 的確誘發 ODC 活性之上升，在預先處理 AT 的實驗中則分別有效抑制了 ODC 之活性 81.5% 85.2% 及 91.3% 的依存效果。(Figure.5)

八.AT 對 TPA 誘發老鼠皮膚腫瘤之抑制作用

在 ICR 系 female mice 設計的兩階段促癌作用在背部皮膚加入不同作用的試藥及作用劑在第一組加入 200 μ l acetone (solvent control) 是為正常控制組，在第二週至第二十四週加入 200 μ l (0.5 nmol)TPA 為 promotor 另外前五分鐘分別在加入不同濃度 200 μ l (0.5 mM) 、200 μ l (1.0 mM) 、200 μ l (2.5 mM) 的 AT 作用劑長達二十四週的觀察期於第二組及第四至六組的第十二週(僅一次)分別加入 200 μ l B[a]P (0.2 mol) initiator, 隨著週數的增加腫瘤數也因為藥物 initiator 及 promotor 的關係而有明顯的增加, 只單獨加入 B[a]P 的 initiator 並不會有腫瘤細胞的生長, 同前者再加入 TPA 腫瘤細胞生長在第 20 週達到 100 % , 在相同 20 週時加入不同濃度 AT 造成腫瘤細胞的生長率分別是 0.5mM 只有 15% , 1.0mM 為 12% , 及 2.5mM 為 11% 有些微的差異但是在分別第 24 週之後隨著 AT 劑量的增加, 老鼠背部腫瘤細胞的抑制情形分別減少了 25% 、25% 及 35% , 另外在第 24 週之後, 單獨加入 TPA 腫瘤細胞生長的數目平均約為 5.5 顆, 但在不同濃度 AT 劑量之下腫瘤細胞分別 3.3 顆、3 顆及 1.6 顆顯示 AT 具有良好的 49% 、46% 及 53% 的抑制效果 (Figure 6- 9)。

伍. 討論

利用 B[a]P 當癌起始劑 (initiator) 及 TPA 當癌促進劑 (promoter) 塗抹在老鼠背部皮膚上，是一種經常被使用的動物實驗模式，它最初被用來研究一些物質的致癌作用，諸如與環境相關的致癌物如多環芳香類化合物、農藥或其他致癌物等，近來則被廣泛用來當成研究抗癌藥物的動物實驗模式。在這模型中常被用來當作癌促進劑的是 phorbol ester 之類的藥物，如 TPA、PMA 等 (76)，它會在老鼠皮膚上引起組織及生化方面的變化如皮膚水腫、增生、增加嗜中性白血球滲出的量 (77)、增加 ODC 活性以及 H_2O_2 和 MPO 活性的增加 (78) 及增加 iNOS、COX-2 大量表現 (49,50,58)，而上述所有的組織生化的變化皆有可能是癌促進作用的指標。基於上述各項敘述，我們利用這個實驗模式來探討 AT 的抗癌作用。

許多可以抑制 TPA 引起的癌促進作用之抑制劑，都是一些抗氧化劑，還有一些具有抗氧化或捕捉活性氧功能的化合物，也抑制老鼠皮膚的癌促進作用或與癌促進作用有關的一些生化反應 (68,75,78)，在本實驗的結果中顯示著 AT 可能具有相同的功能，它的抗癌作用可能是除了捕捉自由基外，另抑制了造成發炎反應之酵素如 COX-2 及 iNOS 等亦是原因之一，但是它真正的分子機轉我們仍未完全明瞭，因此本實驗將進一步針對其抗發炎及抗癌機轉利用細胞實驗深入探討。

另在二段式皮膚腫瘤誘發模式實驗中(41)初始模式是在第一週即加入 initiator B[a]P 的之後加入 TPA promoter 在第六週到第八週即可觀察到腫瘤生長情形，不同於過去的研究模式的是我們先加入

TPA promotor 直到第十二週才加入 B[a]P 的 initiator 在加完藥的第四週即可觀察到腫瘤細胞的生長。在我們應用的模式中亦顯示 AT 具有抑制腫瘤細胞增生及預防腫瘤細胞生長的作用達到 25%、25% 及 35% 的抑制效果,結果與以上的實驗相互關聯。

許多研究指出在老鼠皮膚上給予 TPA 會快速的引起發炎細胞 (inflammatory cell) 如嗜中性白血球 (neutrophils) 及巨噬性白血球 (macrophages) 等的大量堆積(79), 並且會增加活性氧(active oxygen species) 的釋出 (80), 本研究結果也符合這些研究的發現。另根據 Reiners 等 (81) 的研究指出當在老鼠皮膚上以 TPA 處理時, 會誘導 xanthine oxidase, 這會產生超氧陰離子及 H_2O_2 , 在這同時, TPA 抑制了抗氧化酵素 SOD (superoxide dismutase) 及 catalase 的活性 (82,83), 這樣會促使上皮細胞遭受更大的 oxidative stress。而在先前本實驗室的研究中, 我們也發現 AT 有捕捉自由基的能力。

經本研究結果顯示 AT 可以抑制 TPA 所引起的老鼠耳朵發炎水腫反應、背部皮膚增生 (Hyperplasia) 反應、 H_2O_2 和 MPO 酵素活性、ODC 活性、背部皮膚 COX-2 與 iNOS 蛋白質表現等, 因此本研究結果顯示著 AT 在 ICR female mice 的皮膚癌中是扮演著抗癌的角色。

陸. 圖表

Table 1. Inhibitory effect of AT on TPA-induced edema of mouse ear

Group	Treatment ^a	Weight/punch/mg ^b	Inhibition/% ^c
1	Acetone	7.6 ± 1.51	—
2	TPA	12.9 ± 1.06	—
3	AT (2.5mM)	8.0 ± 0.81	—
4	AT (0.5mM) + TPA	10.5 ± 1.04 *	45
5	AT (1.0mM) + TPA	9.3 ± 1.75**	68
6	AT (2.5mM) + TPA	7.8 ± 0.83**	96

a. Mouse ears were treated with acetone (20 μl) 、 TPA (0.5 nmol) in acetone (20 μl) or TPA (0.5 nmol) together with AT in acetone (20 μl). Five hours later, the animals were killed by cervical dislocation and ear punches (diameter 6 mm, measured from the apex) were weighted.

b. The data represent the mean±SD from 6 mice/group

c. Percent of inhibition (%) = [Group 2-group 4(or 5...)/Group 2-group 1] ×100%

P* < 0.05, *P* < 0.01 as compared with TPA-treated group. (n=6)

Table 2. Inhibitory effect of AT on TPA-induced morphological changes in epidermis

Group	Treatment ^a	Epidermal Thickness, ^b μm	Leukocyte Infiltration ^c	Hyperkeratosis ^d
1	Acetone	24.60 \pm 9.16	—	—
2	TPA	70.71 \pm 15.42	+++	++
3	AT (2.5mM)	16.45 \pm 3.42	—	—
4	AT (0.5mM) + TPA	62.50 \pm 6.55	++	+
5	AT (1.0mM) + TPA	59.18 \pm 8.76*	++	+
6	AT (2.5mM) + TPA	57.50 \pm 2.67**	++	+

- a. Mouse dorsal were treated topically with acetone (200 μl), TPA (5 nmol) in acetone (200 μl) or TPA (5 nmol) with AT in acetone (200 μl) twice a day for 7 days. Animals were killed 18 hours after last dose, and skins were processed for histological test.
- b. The data represent the mean \pm SD from 3 mice/group and screen 5 fields/rat.
- c. Leukocyte infiltration that was normal(—), moderate(++) and severe(+++) was characterized by diffuse infiltration of mononuclear infiltrating cells in dermis compared with acetone controls.
- d. Hyperkeratosis was normal(—), slight(+) or moderate(++) was characterized compared with acetone controls.
- * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Statistically from TPA group, t-test. (n=6)

Table 3. Inhibitory effect of AT on the formation of H₂O₂ in mouse epidermis treated with TPA

Group	Treatment ^a	H ₂ O ₂ /nmol/cm ² ^b	inhibition /% ^c
1	Acetone	5.78 ± 1.49	—
2	TPA	16.56 ± 4.66	—
3	AT (2.5mM)	5.31 ± 1.63	—
4	AT (0.5mM) + TPA	7.57 ± 3.26*	83
5	AT (1.0mM) + TPA	6.84 ± 2.72*	90
6	AT (2.5mM) + TPA	6.14 ± 3.28*	96

a. Mouse dorsal were treated topically with acetone (200 µl), TPA (5 nmol) in acetone (200 µl) or TPA (5 nmol) with AT in acetone (200 µl). Animals were killed 1 hour after the second TPA application and skins were removed.

b. H₂O₂ activity was determined. represent the mean±SD from 6 mice/group

c. Percent of inhibition(%)=Group2-Group3(or4,5,6)/Group2-Group ×100%

**P* < 0.05,. Statistically different from TPA group, t-test. (n=6)

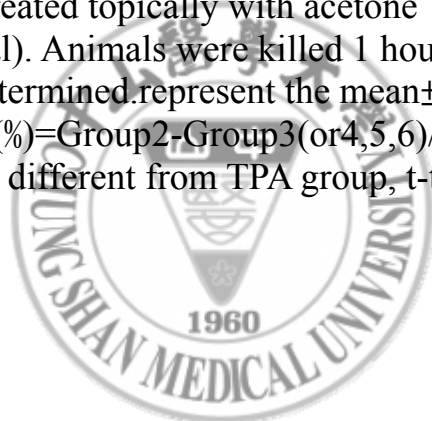


Table 4. Inhibitory effect of AT on the MPO activity in mouse skin treated with TPA

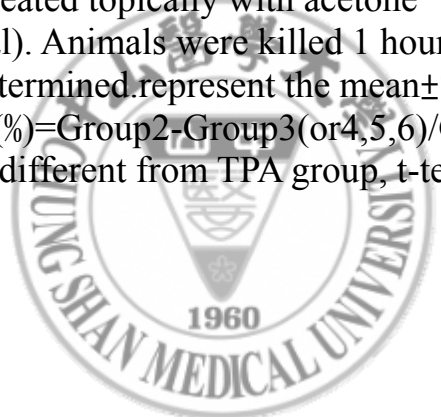
Group	Treatment ^a	MPO/units/cm ² ^b	inhibition /% ^c
1	Acetone	12.36 ± 5.23	—
2	TPA	344.53 ± 55.05	—
3	AT (2.5mM)	15.76 ± 8.87	—
4	AT (0.5mM) + TPA	150.66 ± 39.06*	58
5	AT (1.0mM) + TPA	141.76 ± 38.43*	61
6	AT (2.5mM) + TPA	21.29 ± 5.24*	97

a. Mouse dorsal were treated topically with acetone (200 µl), TPA (5 nmol) in acetone (200 µl) or TPA (5 nmol) with AT in acetone (200 µl). Animals were killed 1 hour after the second TPA application and skins were removed.

b. H₂O₂ activity was determined. represent the mean±SD from 6 mice/group

c. Percent of inhibition(%)=Group2-Group3(or4,5,6)/Group2-Group ×100%

**P* < 0.05, Statistically different from TPA group, t-test. (n=6)



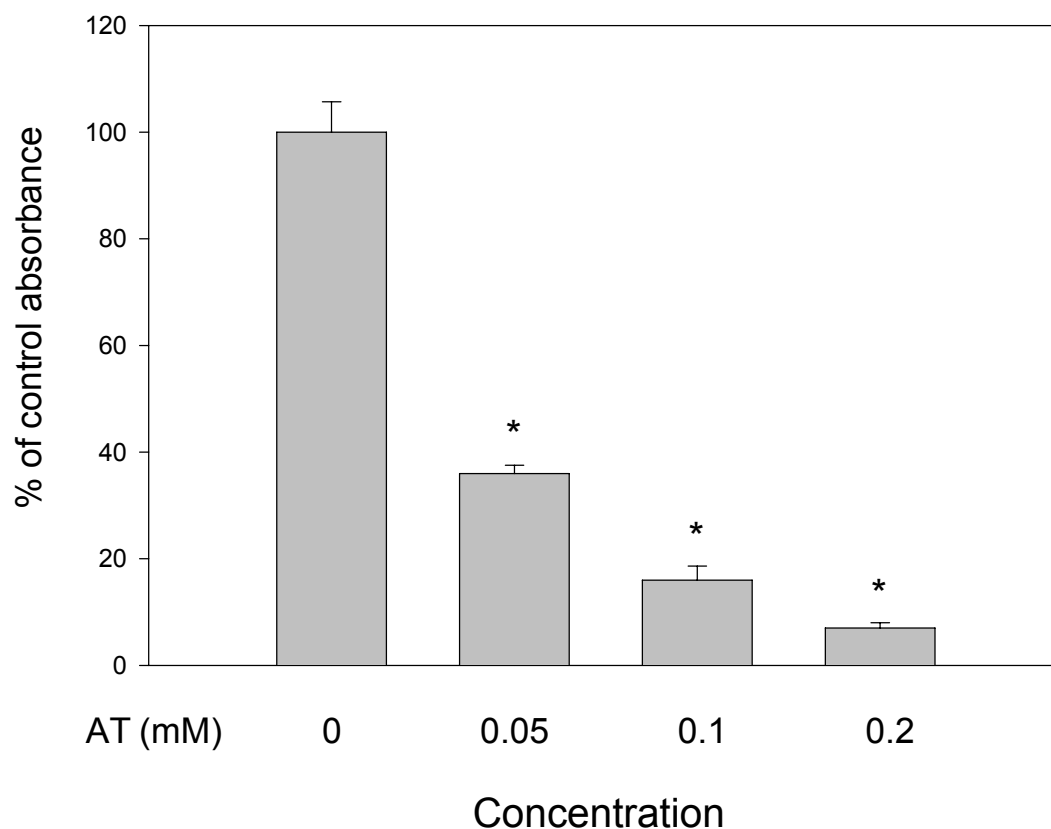
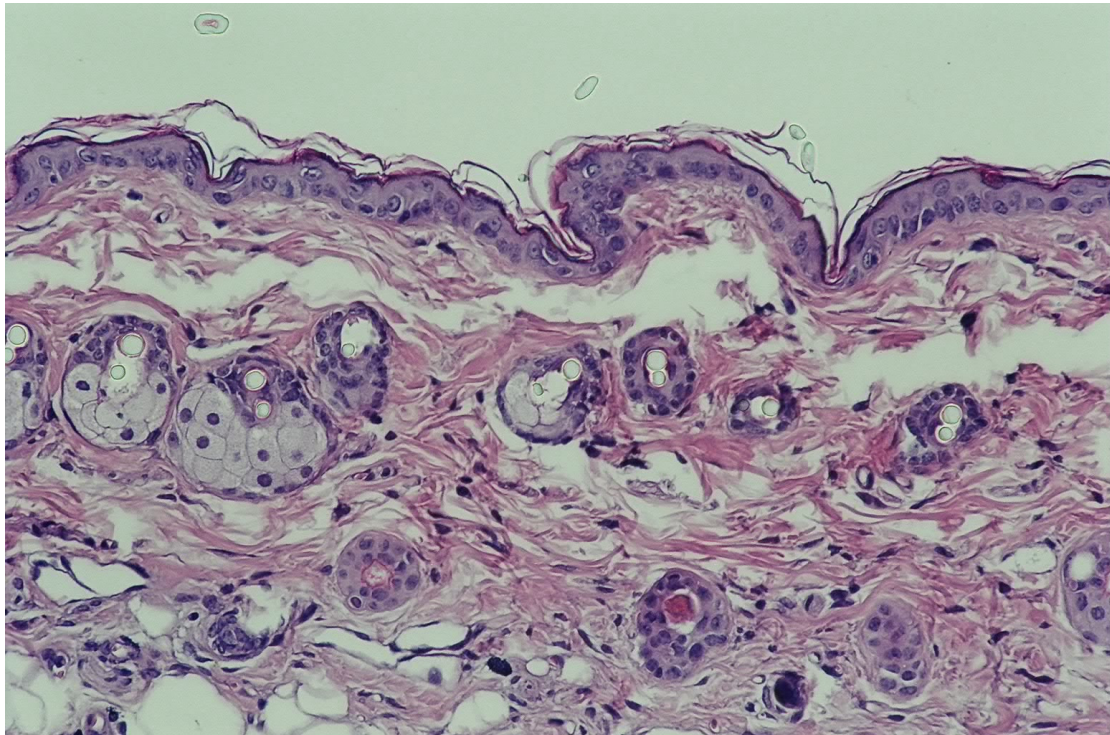


Fig 1. Effect of AT on DPPH bleaching.

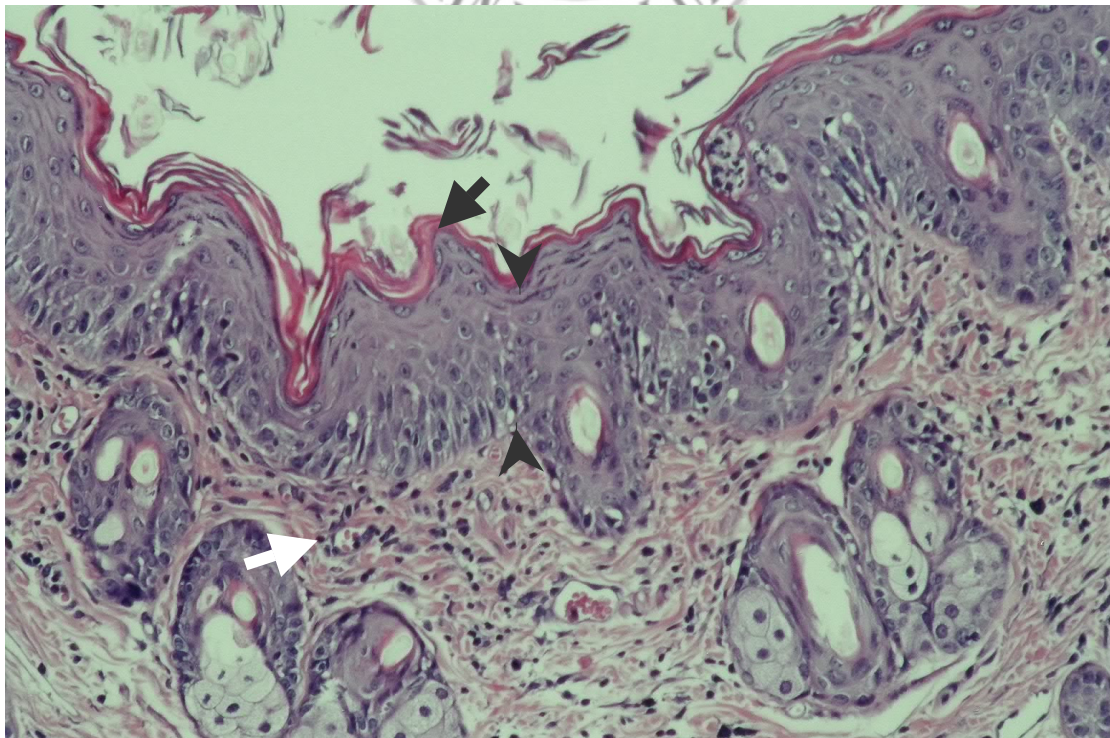
The reaction mixture contained, in 3 ml of methanol, 10mM DPPH and various concentration of AT in DMSO. After 30 min at room temperature, 1 ml of redistilled water and 3 ml toluene were added and samples were mixed and centrifuged. The absorbance of the upper phase was read at 517 nm. Percentage of DPPH bleaching = $[(\text{absorbance of DMSO} - \text{absorbance of test}) / \text{absorbance of DMSO}] \times 100\%$; Data represent the mean \pm SD from three independent experiments.

* $P < 0.0001$, Compared with solvent control, t-test.(n=3)

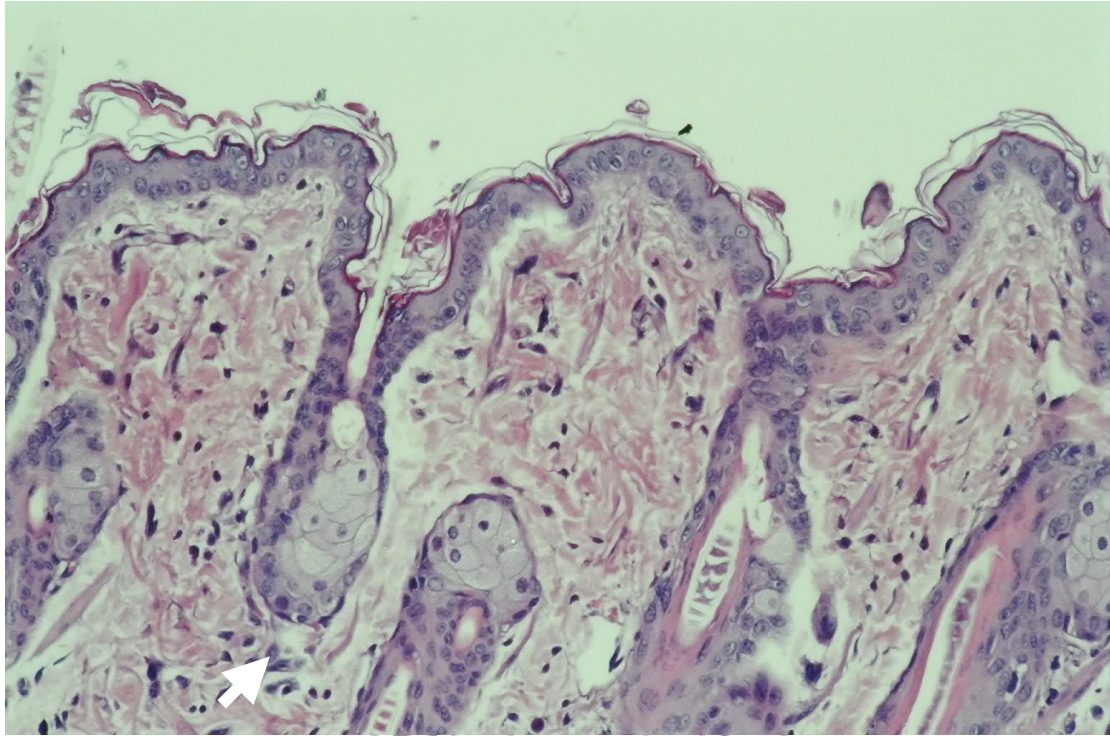
(A) Acetone



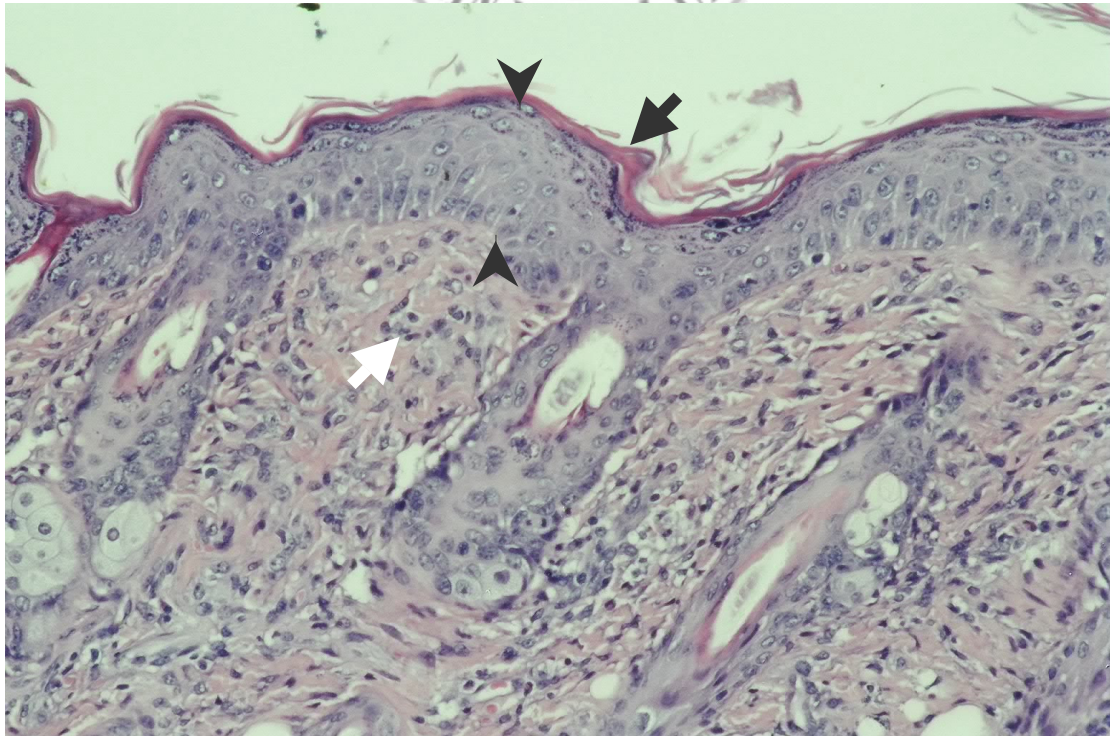
(B) TPA



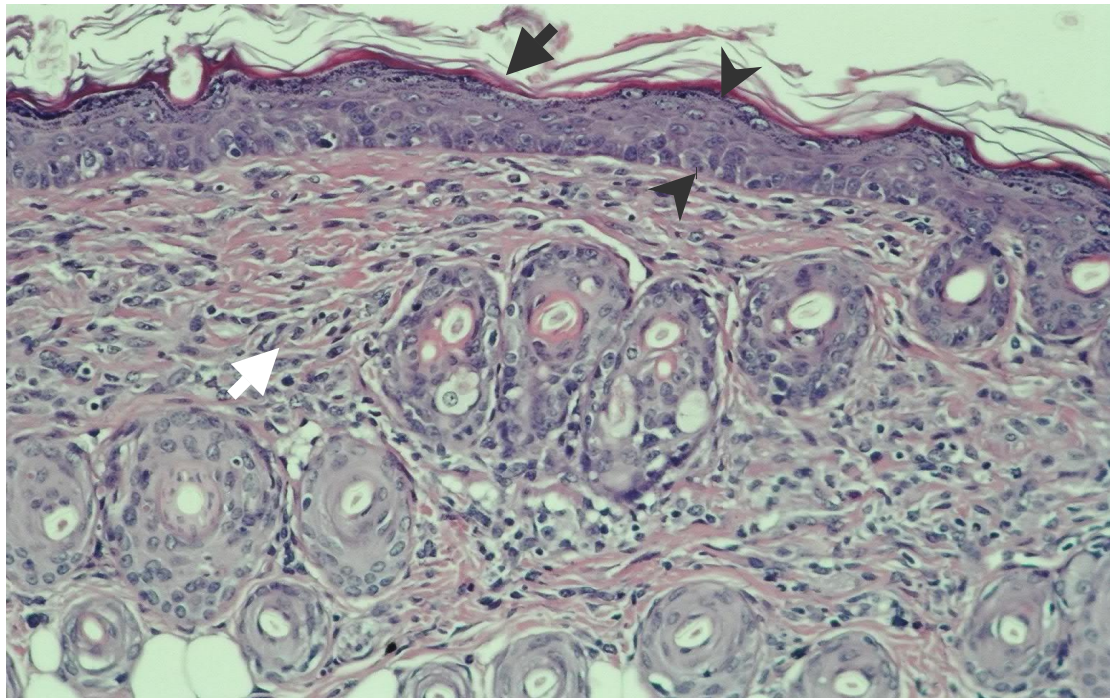
(C) AT 2.5mM



(D) AT 0.5mM + TPA



(E) AT 1.0mM + TPA



(F) AT 2.5mM + TPA

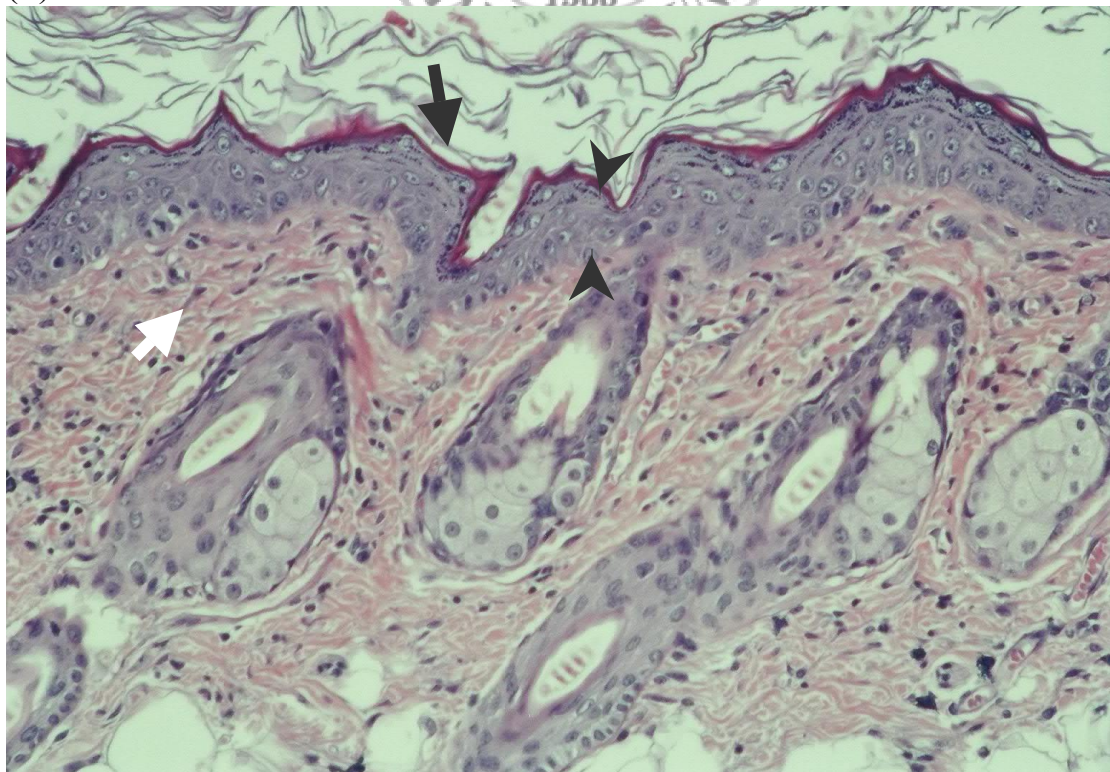
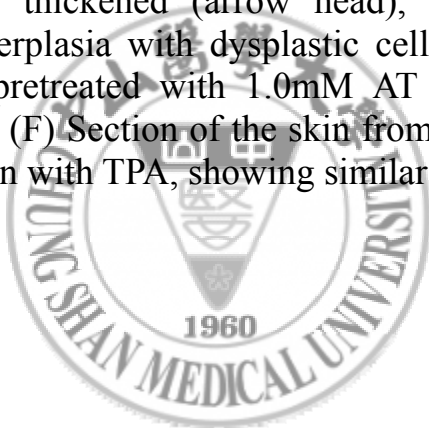


Fig 2. Inhibitory effect of Ailanthoidol on TPA-induced epidermal hyperplasia in mice.

Mouse dorsal were treated twice a day for 7 days, and animals were sacrificed 18 hours after last dose; skin biopsies were processed for hematoxylin and eosin staining. (A) Section of the skin from a control animal treated with solvent (acetone). (B) Section of the skin from an animal treated with TPA (5 nmol), showing severe leukocyte infiltration in the dermis (white arrow), and the epidermis become thickened (arrow head), severe hyperkeratosis (black arrow) and hyperplasia with dysplastic cells. (C) Section of the skin from an animal treated with 2.5mM Ailanthoidol, showing mild infiltration (white arrow). (D) Section of the skin from an animal pretreated with 0.5mM AT and then with TPA, showing moderate leukocyte infiltration in the dermis (white arrow), and the epidermis become thickened (arrow head), slight hyperkeratosis (black arrow) and hyperplasia with dysplastic cells. (E) Section of the skin from an animal pretreated with 1.0mM AT and then with TPA, showing similar to (D). (F) Section of the skin from an animal pretreated with 2.5mM AT and then with TPA, showing similar to (D).



TPA (0.025 mM)	-	+	-	+	+	+
AT (0.5 mM)	-	-	-	+	-	-
AT (1.0 mM)	-	-	-	-	+	-
AT (2.5 mM)	-	-	+	-	-	+

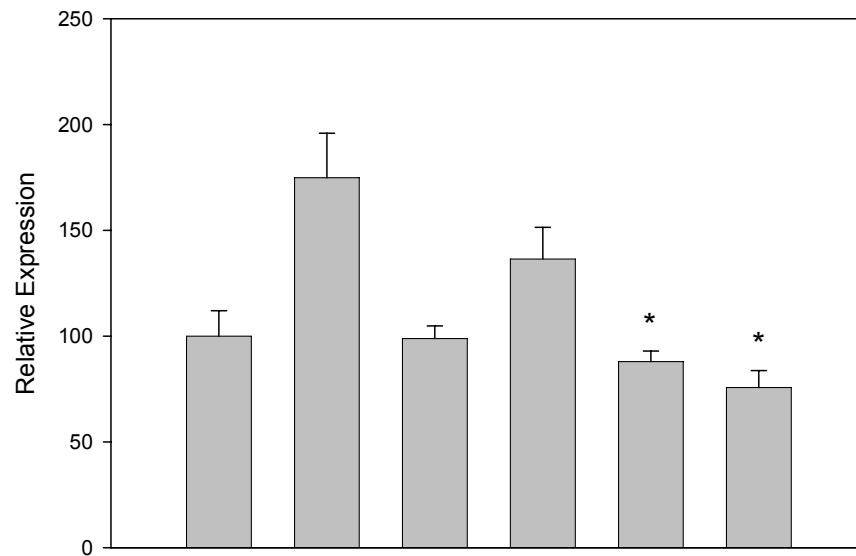
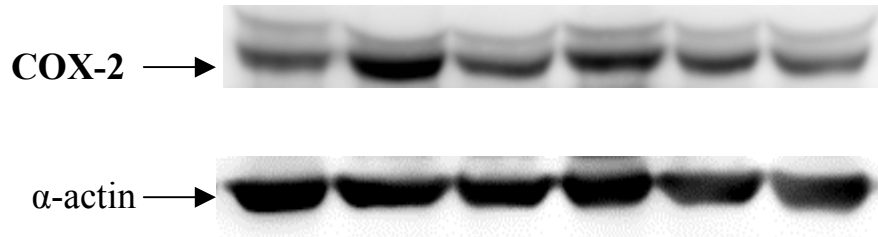


Fig 3. Effect of AT on the expression of epidermis COX-2 after TPA administration in mouse.

Mouse dorsal shaven area was treated topically with acetone (0.2 ml), TPA (0.025 mM) in acetone or AT (0.5~2.5 mM) along with/without TPA. Five hours after the treatment, the mice were killed and the epidermis were removed from skins as described in the text. Immunoblotting analyses of COX-2 of epidermis were done, the data are presented from one mouse per group and each lane contained 80 μ g protein. Other rats in each group showed patterns of protein expression of the COX-2 similar to the representation. * $P < 0.01$ compared with the group treated with TPA alone. (n=6)

TPA (0.025 mM)	-	+	-	+	+	+
AT (0.5 mM)	-	-	-	+	-	-
AT (1.0 mM)	-	-	-	-	+	-
AT (2.5 mM)	-	-	+	-	-	+

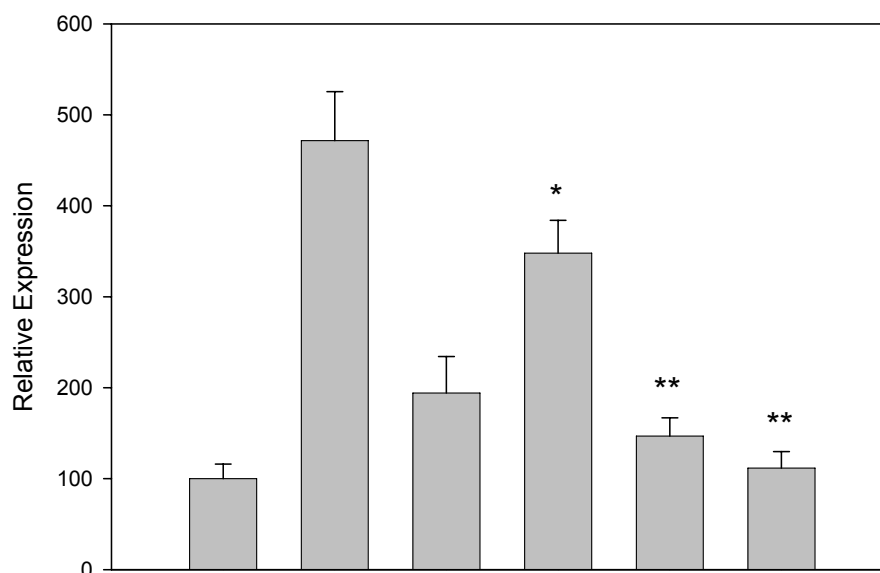
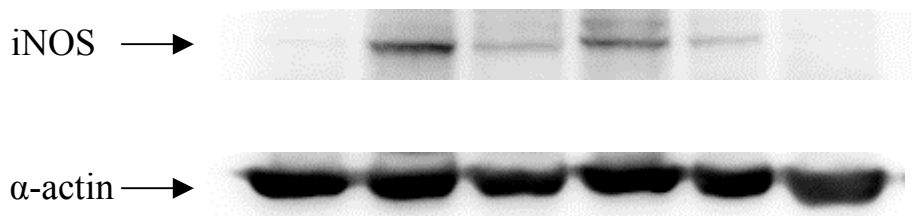


Fig 4. Effect of Ailanthoidol on the expression of epidermis iNOS after TPA administration in mouse.

Mouse dorsal shaven area was treated topically with acetone (0.2 ml), TPA (0.025 mM) in acetone or Ailanthoidol (0.5~2.5 mM) along with/without TPA. Five hours after the treatment, the mice were killed and the epidermis were removed from skins as described in the text. Immunoblotting analyses of iNOS of epidermis were done, the data are presented from one mouse per group and each lane contained 80 μ g protein. Other rats in each group showed patterns of protein expression of the iNOS similar to the representation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared with the group treated with TPA alone. (n=6)

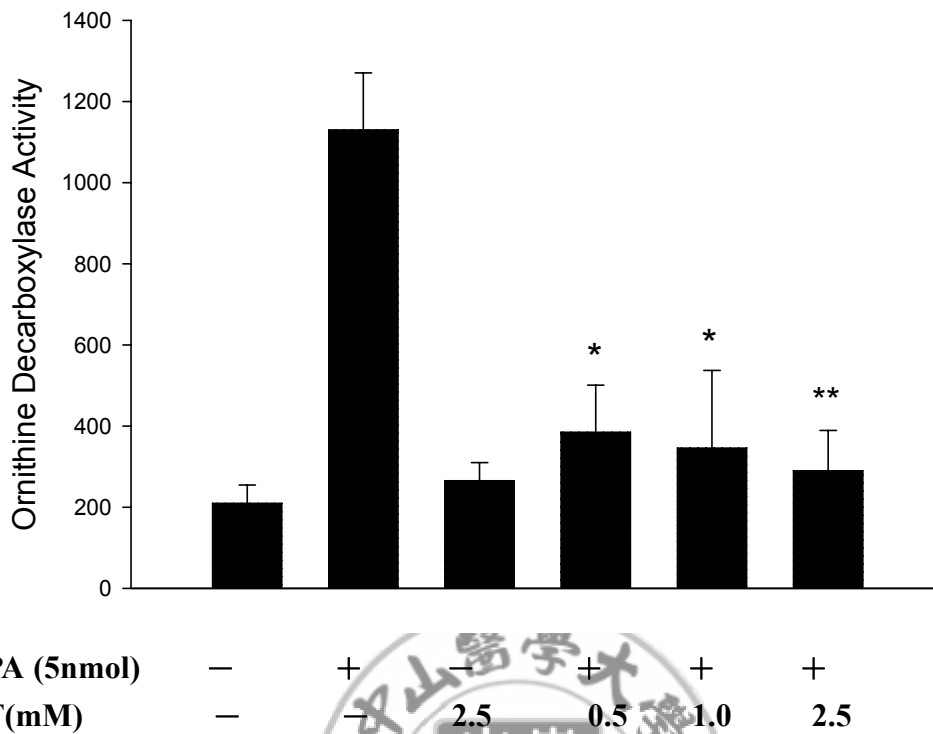


Fig 5. Inhibitory effect of AT on TPA-induced epidermal ornithine decarboxylase activity.

Mouse dorsal was treated topically with acetone (0.2 ml), TPA (5 nmol) in acetone or AT (0.5~2.5 mM) along with/without TPA. Mice were killed five hours later and the epidermis was isolated. Ornithine decarboxylase activity was determined and the activity was presented as pmol CO₂/mg protein/h. *P<0.001, **P<0.0001 compared with the group treated with TPA alone. (n=6)

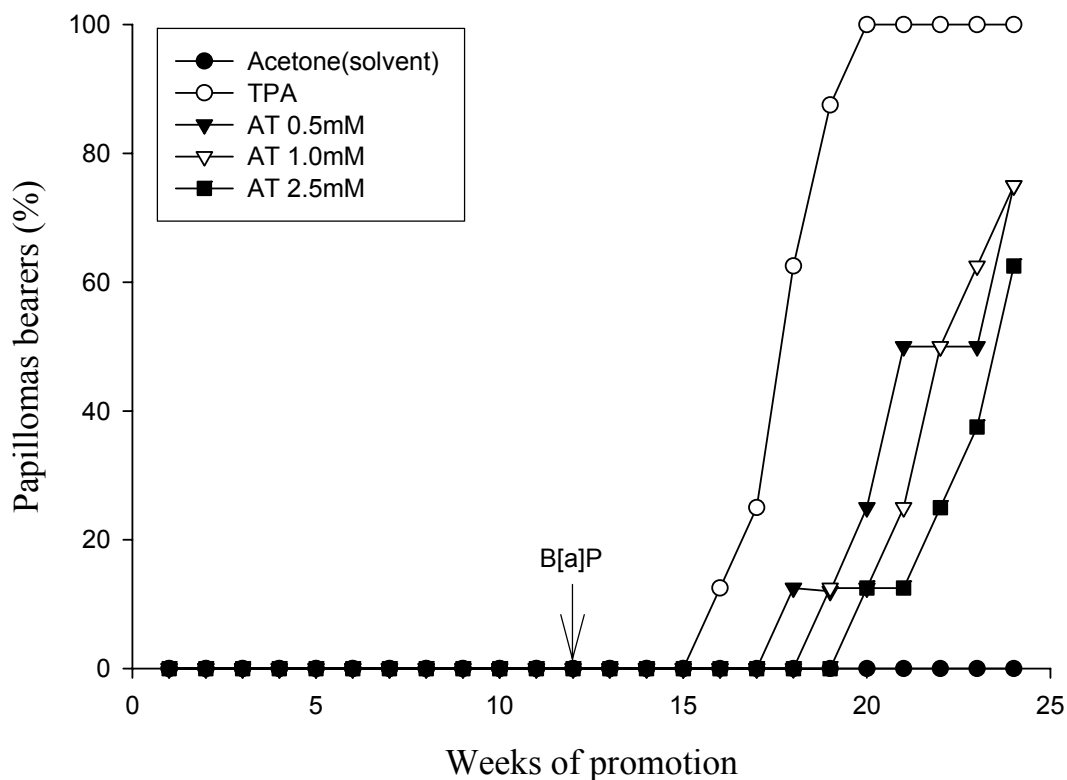


Fig. 6 Inhibitory effect of AT on TPA-Induced tumor promotion in mouse skin.

Mice dorsal shaven area was treated topically with acetone (0.2 ml), TPA (5 nmol) in acetone or AT (0.5-2.5 mM) along with/without TPA three times per week. After 12 weeks, the mouse was treated with B[a]P except solvent control (acetone) group. After another 12 weeks, mouse was sacrificed and skin tumors >1 mm diameter were counted and recorded every week. The inhibitory effect of AT were showed by percentage of mouse with Papillomas. (n=6)

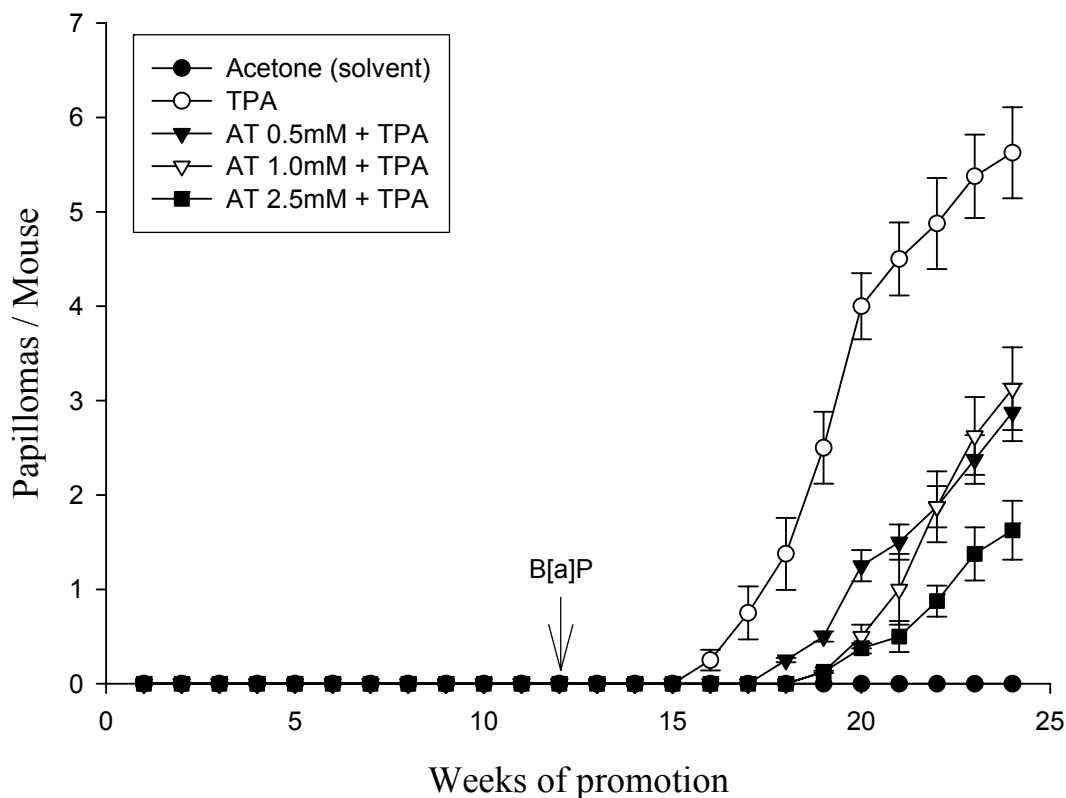
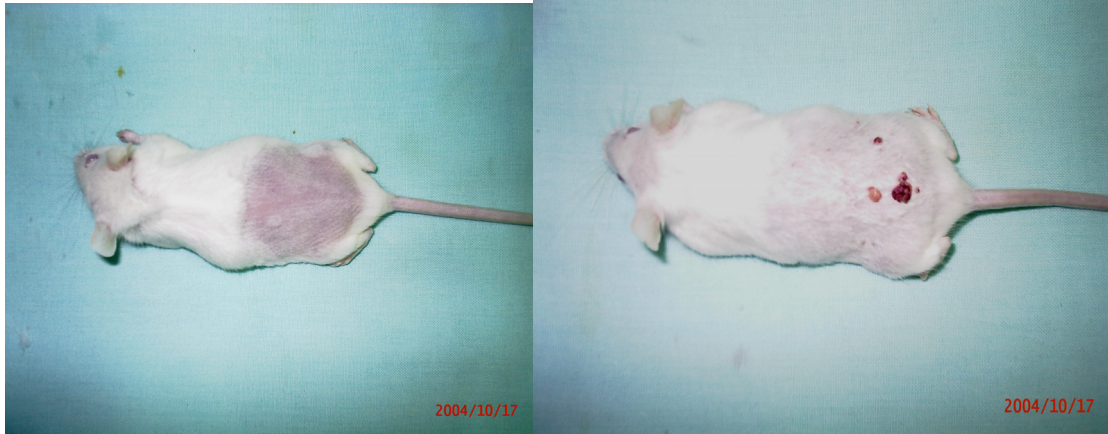


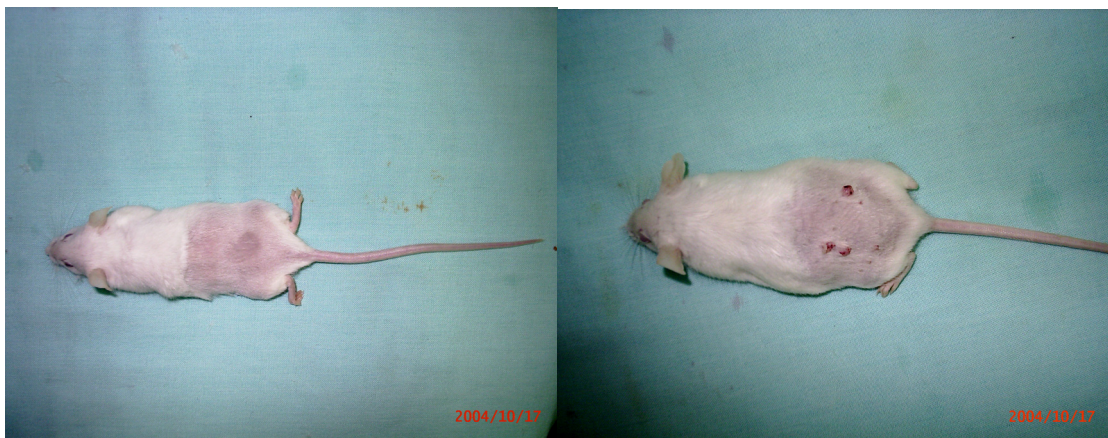
Fig. 7 Inhibitory effect of AT on TPA-Induced tumor promotion in mouse skin.

Mice dorsal shaven area was treated topically with acetone (0.2 ml), TPA (5 nmol) in acetone or AT (0.5-2.5 mM) along with/without TPA three times per week. After 12 weeks, the mouse was treated with B[a]P except solvent control (acetone) group. After another 12 weeks, mouse was sacrificed and skin tumors >1 mm diameter were counted and recorded every week. The inhibitory effect of AT were showed by average number of papillomas/mouse. (n=6)



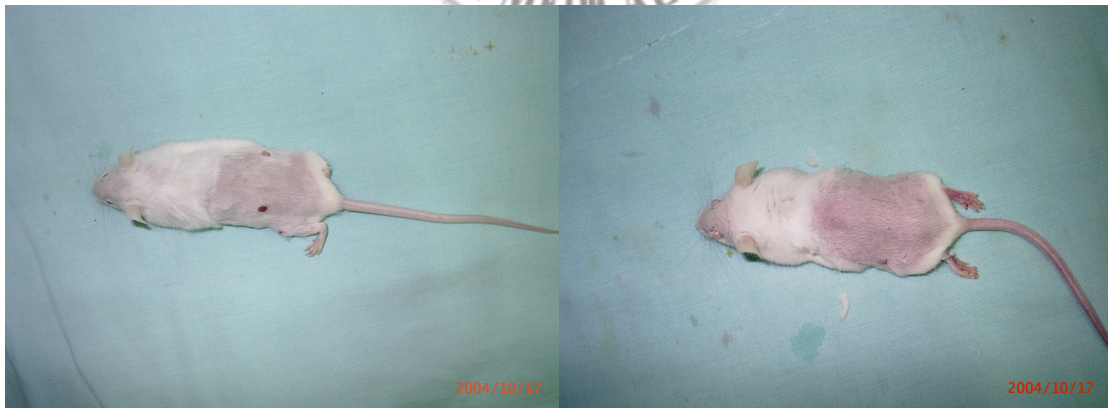
(a).Acetone

(b) TPA 0.5nmol



(c) AT 2.5mM

(d) AT 0.5 mM +TPA 0.5 nmol



(e) AT 1.0 mM +TPA 0.5 nmol

(f) AT 2.5 mM +TPA 0.5 nmol

Fig. 8 Inhibitory effect of AT on TPA-induced tumor promotion with B[a]P initiation in mouse skin.

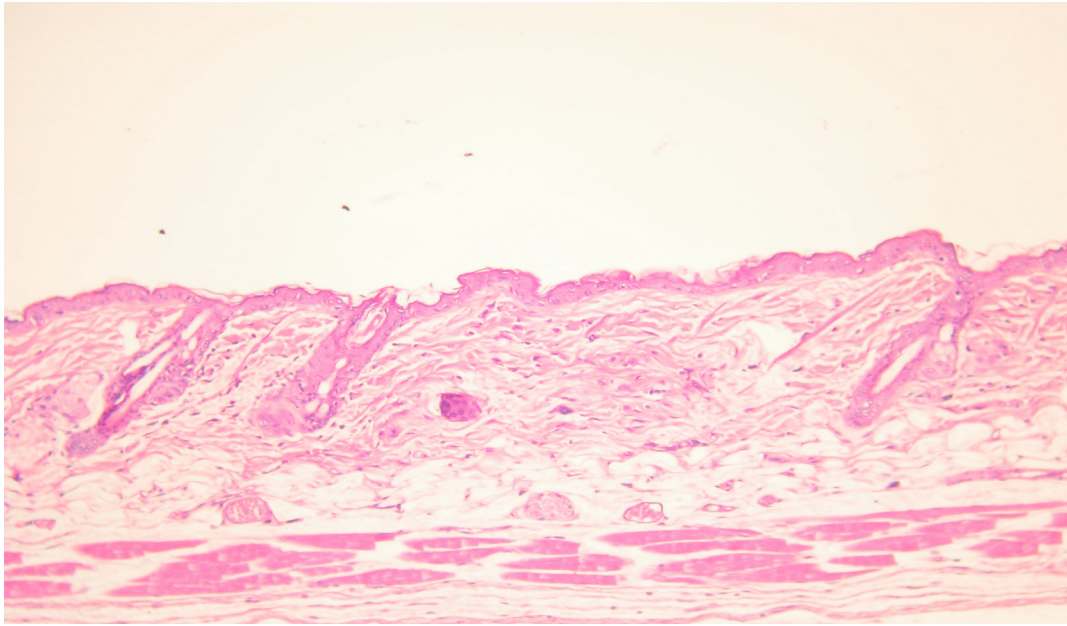
(a).acetone

(b) Acetone+ B[a]P(0.2 mol)

(c) Acetone + TPA (0.5 nmol)

(d)~(f) AT (0.5 mM, 1.0 mM, 2.5 mM) + TPA (0.5 nmol)+ B[a]P(0.2 mol)

(A) Dorsal skin of control mouse



(B) Dorsal skin of squamous papillomas mouse

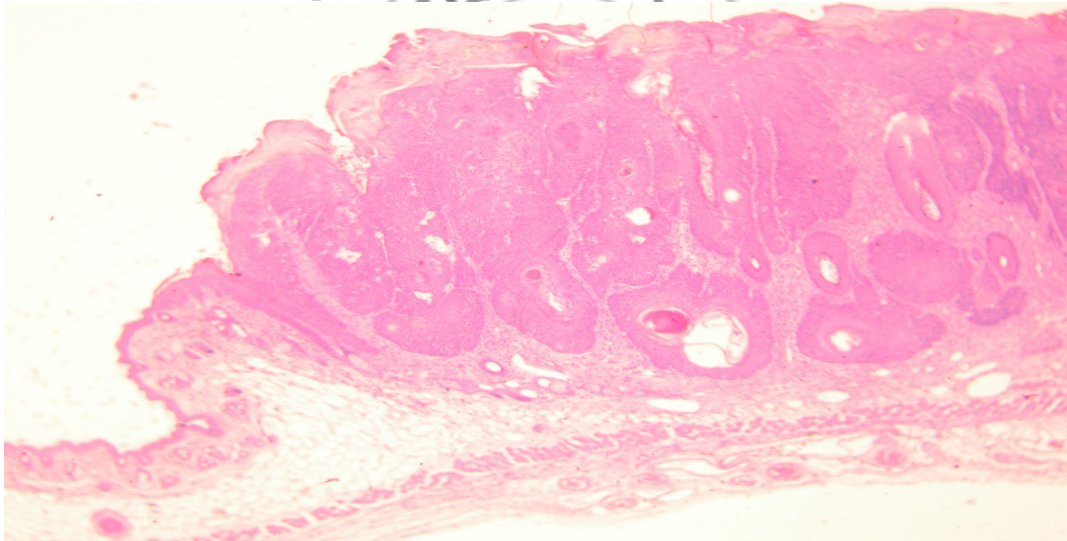


Fig. 9 Pathology of normal and tumor skin of mouse.

Sections from squamous carcinomas from dorsal skin of control mouse (A) and squamous papillomas from stimulator-treated mouse (B). Section of the skin from an animal treated with TPA (5 nmol) and B[a]P, showing have squamous papillomas formation.

柒. 參考文獻

1. Sheen, W. S., The chemical constituents of stem woods of *Zanthoxylum ailanthoides* in Taiwan. Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences, Kaohsiung Medical College, Taiwan, 1992, 1-8 .
2. Fokialakis, N., Magiatis, P., Mitaku, S., Pratsinis, H., Tillequin, F. Estrogenic activity of phenylpropanoids from *Sarcomelicope megistophylla* and structure determination of a new norneolignan *Planta Med.* 2003, 69, 566-568.
3. Huang, M. T., Ho, C. T., Wang, Z. Y., Ferraro, T., Finnegan-Olive, T., Lou, Y. R., Mitchell, J. M., Laskin, J. D., Newmark, H., Yang, C. S., Conney, A. H. Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis* 1992, 13, 947-954.
4. Chen, L. C., Sly, L., Junes, C. S., Tarone, R., Deluca, L. M. Differential effects of dietary β -carotene on papilloma and carcinoma formation induced by an initiation-promotion protocol in *SENCAR* mouse skin. *Carcinogenesis* 1993, 14, 713-717.
5. Kozumbo, W. J., Seed, J. L., Kensler, T. W. Inhibition by 2(3)-tert-butyl-4-hydroxy anisole and other antioxidants of epidermal ornithine decarboxylase activity induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 1983, 43, 2555-2559.
6. Huang, M. T., Wang, Z. T., Georgiadis, C. A., Laskin, J. D., Conney, A. H. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 1992, 13, 2183-2186.
7. Linsalata, M., Cavallini, A., Di Leo, A. Polyamine oxidase activity and polyamine levels in human colorectal cancer and in normal surrounding mucosa. *Anticancer Res.* 1997, 17, 3757-3760.

8. Hong, S.H., Avis, I., Vos, M. D., Martinez, A., Treston, A.M., Mulshine, J.L. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res.* 1999, 59, 2223-2228.
9. Brown, N.S., Bicknell, R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress - its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2001, 3, 323-327.
10. Tanaka, T. Chemoprevention of human cancer: biology and therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1997, 25, 139-174.
11. Digiovanni, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Therapy* 1992, 54, 63-128.
12. Xiong, Q. B., Shi, D. W., Morphological and histological studies of Chinese traditional drug "hua jiao" (pericarpium zanthoxyli) and its allied drugs. *Yao Xue Xue Bao* 1991, 26, 938-47.
13. Sheen, W. S., Tsai, I. L., Teng, C. M., Chen, I. S. Nor-neolignan and phenyl propanoid from *Zanthoxylum ailanthoides*. *Phytochem.* 1994, 36, 213-215.
14. Lin, S. Y., Chen, C. L., Lee, Y. J. Total synthesis of Ailanthoidol and precursor XH14 by Stille Coupling. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 2968-2971.
15. Kao, C. L., Chern, J. W. A novel strategy for the synthesis of Benzofuran skeleton neolignans: application to ailanthoidol, XH-14, and obovaten. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 6772-6787.
16. Lambert, J. D., Meyers, R. O., Timmermann, B. N., Dorr, R. T.

tetra-O-Methylnordihydroguaiaretic acid inhibits melanoma in vivo. *Cancer Lett.* 2001, 171, 47-56.

17. Ikeda, R. N., Nagao, T., Okabe, H., Nakan, Y., Matsunaga, H., Katano, M., Mori, M. Antiproliferative constituents in umbelliferae plants. III. Constituents in the root and the ground part of *Anthriscus sylvestris* Hoffm *Chem. Pharm. Bull.* 1998, 46, 871-874.
18. Craigo, J., Callahan, M., Huang, R.C., DeLucia, A. L. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expressive by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res.* 2000, 47, 19-28.
19. Gordaliza, M., Castro, M. A., del Corral, J. M. M., López-Vázquez, M. L. In vivo immunosuppressive activity of some cyclolignans. *Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 2781-2786.
20. Chen, C. C., Hsin, W. C., Ko, F. N., Huang, Y. L., Ou, J. C., Teng, C. M. Antiplatelet aryl naphthalide lignans from *Justicia procumbens*. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 1149-1150.
21. Silva, D. H., Pereira, F. C., Zanoni, M. V., Yoshida, M. Lipophyllic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. *Phytochem.* 2001, 57, 437-442.
22. Brader, G., Vajrodaya, S., Greger, H., Bacher, M., Kalchhauser, H., Hofer, O. Bisamides. lignans triterpenes and insecticidal cyclopenta [b]-benzofurans from *Aglaia* species. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 1482-1490.
23. Borsato, M. L., Grael, C. F., Souza, G. E., Lopes, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides* *Phytochem.* 2000, 55, 809-813.

24. Zacchino, S., Rodriguez, G., Pezzenati, G., Orellana, G. In vitro evaluation of antifungal properties of 8.O.4'-neolignans. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 659-662.
25. Ward, R. S. Lignans, neolignans, and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 1995, 12, 183-205.
26. Den, T. I., Lital, K. B., Pieter, V. V., Arts, C. J., Adlercreutz, H., Thijssen, J. H. Urinary phytoestrogens and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001, 10, 223-228.
27. Chien, C. T., Chou, S. T., Chung, Y. C. Studies of the antioxidant activity and the safety of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. The 29th Nutrition Congress of Taipei, 2003
28. Morita, N., Shimizu, M. Studies on the medical resources. XXV. The components in the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides* Engl. *Yakugaku Zasshi.* 1966, 86,732-4.
29. Cheng, M. J. Studies on the Chemical Constituents and Biological Activities from Formosan Plants-*Zanthoxylum ailanthoides*, *Z. beecheyanum*, *Z. schinifolium*, *Machilus zuihoensis* and *Peperomia sui*. Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan , 2002.1-12
30. Adlercreutz, H., Mazur, W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.* 1997, 29, 95-120.
31. Bingham, S. A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L., Coward. A. Phyto-oestrogens: where are we know? *J. Nutr.* 1998, 79, 393-406.
32. Seymour, J. K. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 2005, 77, 598-617.

33. Banerjee, S., Manna, S., Black tea polyphenols suppress cell proliferation and induce apoptosis during benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 2005 3,215-221.
34. Slaga, T. J. Overview of tumor promotion in animals. *Environ. Health. Perspect.* 1983, 50, 3-14.
35. Guo, Y., Cleveland, J. L., O' Brien, T. G. Haploinsufficiency for *odc* Modifies mouse skin tumor. *Cancer Res.* 2005, 15, 1146-1149.
36. DiGiovanni, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol. Therapy* 1992, 54, 63-128.
37. DiGiovanni, J. Modification of multistage carcinogenesis. In: Ito, N., Sugano, H. (Ed.), *Modification of Tumor Development in Rodents. Prog. Exp. Tumor Res.* 1991, 33, 192-229.
38. Katiyar, S. K., Mukhtar, H. Inhibition of phorbol ester tumor promoter 12 -O- tetradecanoylphorbol- 13- acetate - caused inflammatory responses in *SENCAR* mouse skin by black tea polyphenols. *Carcinogenesis* 1997, 18, 1911-1916.
39. Slaga, T. J., Fischer, S. M., Weeks, C. E., Klein-Szanto, A. J.P., Reiners, J. Studies on the mechanisms involved in multistage carcinogenesis in mouse skin. *J. Cell. Biochem.* 1982, 18, 99-119.
40. Kim, M., Murakami, A., Kawabata, K., Ohigashi, H. (-)-Epigallo catechin-3-gallate promotes pro-matrix metal proteinase-7 production via activation of the JNK1/2 pathway in HT-29 human colorectal cancer cell. *Carcinogenesis* 2005, in press.
41. Momdal, S., Brankow, D. W., and Heidelbergor, C. Two-stage chemical oncogene is culture of C3H10T1/2 cells. *Cancer Res.* 1976, 36, 2254-2260.

42. Chun, K. S., Kang, J. Y., Kim, O. H., Kang, H., Surh, Y. J. Effects of yakuchinone A and yakuchinone B on the phorbol ester-induced expression of COX-2 and iNOS and activation of NF- κ B in mouse skin. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2002, 21, 131-139.
43. Katiyar, S. K., Rupp, C. O., Korman, N. J., Agarwal, R., Mukhtar, H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and other skin tumor promoter-caused induction of epidermal interleukin-1 alpha mRNA and protein expression in *SENCAR* mice by green tea polyphenols. *J. Invest. Dermatol.* 1995, 105, 394-398.
44. Katiyar, S. K., Agarwal, R., Mukhtar, H. Inhibition of tumor promotion in *SENCAR* mouse skin by ethanol extract of *Zingiber officinale* rhizome. *Cancer Res.* 1996, 56, 1023-1030.
45. Seo, H. J., Park, K. K., Han, S. S., Chung, W. Y., Son, M. W., Kim, W.B., and Surh, Y.J. Inhibitory effects of the standardized extract (DA-9601) of *Artemisia asiatica* Nakai on phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity, papilloma formation, cyclooxygenase-2 expression, inducible nitric oxide synthase expression and nuclear transcription factor kappa B activation in mouse skin. *Int. J. Cancer* 2002, 100, 456-462.
46. Wei, H. and Frankel, K. *In vivo* formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin. *Cancer Res.* 1991, 51, 4443-4449.
47. Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., and Simmons, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88, 2692-2696.
48. Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of

- action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 1971, 231, 232-235.
49. Kuo, C. L., Chi, C. W., Liu, T. Y. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 2004, 203, 127-137.
50. Afaq, F., Saleem, M., Aziz, M. H., Mukhtar, H. Inhibition of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by oleandrin. *Toxicolo.and Appl.Pharma.* 2004, 195, 361-369.
51. Ben-Av, P., Crofford, L. J., Wilder, R. L., Hla, T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995, 372, 83-87.
52. Lowenstein, C. J., Hill, S. L., Lafond-Walker, A., Wu, J., Allen, G., Landavere, M., Rose, N. R., and Herskowitz, A. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J. Clin. Invest.* 1996, 97, 1837-1843.
53. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., and Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deiminase and iminonitrogen oxidation to nitrite. *Sci.* 1987, 235, 473-476.
54. Ohshima, H., and Bartsch, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mut. Res.* 1994, 305, 253-264.
55. Duval, D. L., Miller, D. R., Collier, J., and Billings, R. E. Characterization of hepatic nitric oxide synthase: identification as the cytokine-inducible form primarily regulated by oxidants. *Mol. Pharmacol.* 1996, 50, 277-284.

56. Vodovotz, Y., Lucia, M. S., Flanders, K. C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., Weidner, J., Mumford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A. B., Lippa, C. F., and Sporn, M. B. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 1996, 184, 1425-1433.
57. Eissa, T., Yuan, J. W., Haggerty, C. M., Choo, E. K., Palmer, C. D., and Moss, J. Cloning and characterization of human inducible nitric oxide synthase splice variants: A domain, encoded by exons 8 and 9, is critical for dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95, 7625-7630.
58. Yamashita, M., Ashino, S., Oshima, Y., Kawamura, S., Ohuchi, K., Takayanagi, M. Inhibition of TPA-induced NF- κ B nuclear translocation and production of NO and PGE₂ by the anti-rheumatic gold compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* 2003, 55, 245-251.
59. Marton, L. J., and Pegg, A. E. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharm. Tox.* 1995, 35, 55-91.
60. Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L. C., and Holtta, E. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 1992, 360, 355-358.
61. Mohan, R. R., Challa, A., Gupta, S., Bostwick, D. C., Ahmad, N., Agarwal, R., Marengo, S. R., Amini, S. B., Paras, F., MacLennan, G. T., Resnick, M. I., and Mukhtar, H. Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5, 143-147.
62. Auvinen, M. Cell transformation, invasion, and angiogenesis: a regulatory role for ornithine decarboxylase and polyamines? *J. Natl. Cancer Inst.* 1997, 89, 533-537.

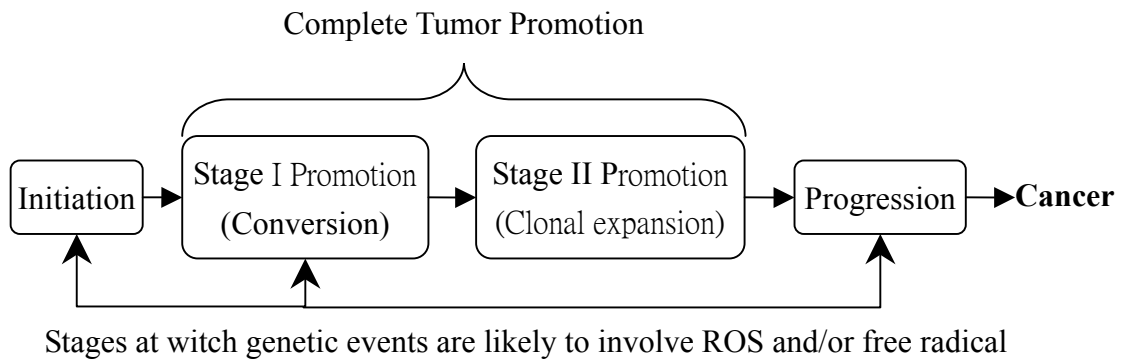
63. Nakadate, T., Aizu, E., Yamamoto, S., Fujiki, H., Sugimura, T., and Kato, R. Inhibition of teleocidin-caused epidermal ornithine decarboxylase induction by phospholipase A₂-, cyclooxygenase- and lipoxygenase-inhibitors. *Jpn. J. Pharmacol.* 1985, 37, 253-258.
64. Zhang, H., Lin, L., Cheng, L., Zhang, p. Express of plasma ROS, SOD and GSH-PX in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Lin Chuang Er.Bi.Yan Hou Ke Za Zhi* 2003, 17, 650-651.
65. Shimada, K., Fujikawa, K. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food chem.* 1992, 40, 945-948.
66. Ursini,F., Maiorino,M., Morazzoni,P., Roveri,A., Pifferi,G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic. Biol. Med.* 1994, 16, 547-553.
67. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahar, K. and Nakamura, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* 1992, 40, 945-948.
68. Huang, M. T., Smart, R. C., Wong, C. Q., and Conney, A. H. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 1988, 48, 5941-5946.
69. Pick E and Keisari Y., A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 1980, 38, 161-170.
70. Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., Brit, D.F., Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice *Cancer Res.* 1990, 50, 499-502.

71. Huachen, W., Krystyna, F. Suppression of tumor promoter induced Oxidative events and DNA damage *in vivo* by Sarcophytol A: A possible mechanism of antipromotion. *Cancer Res.* 1992, 52, 2298-2303.
72. Krystyna, F. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmac.Ther.*,1992, 53, 127-166.
73. Smart, R. C., Huang, M. T., and Conney, A. H. sn-1,2-Diacylglycerols mimic the effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate *in vivo* by inducing biochemical changes associated with tumor promotion in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 1986, 7, 1865-1870.
74. Huang, M. T., Wang, Z. Y., Georgiadis, C. A., Laskin, J. D., Conney, A. H. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 1992, 13, 2183-2186.
75. Fuchs, E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.* 1990, 111, 2807-2814.
76. O'Brien, T. G., Simsiman, R. C., and Boutwell, R. K. Induction of the polyamine- biosynthetic enzyme in mouse epidermis by tumor-promoting agents. *Cancer Res.* 1975, 35, 1662-1670.
77. Lim, J. S., Frenkel, K., and Troll, W. Tamoxifen suppresses tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation by human neutrophils. *Cancer Res.* 1992, 52, 4969-4972.
78. Lee, M. J., Wang, C. J. , Tsai, Y. Y., Hwang, J. M., Lin, W. L., Tseng, T. H., and Chu, C.Y. Inhibitory effect of 12-O- tetradecanoylphorbol -13-acetate-caused tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse skin by baicalein. *Nutr. Cancer* 1999, 34, 185-191.

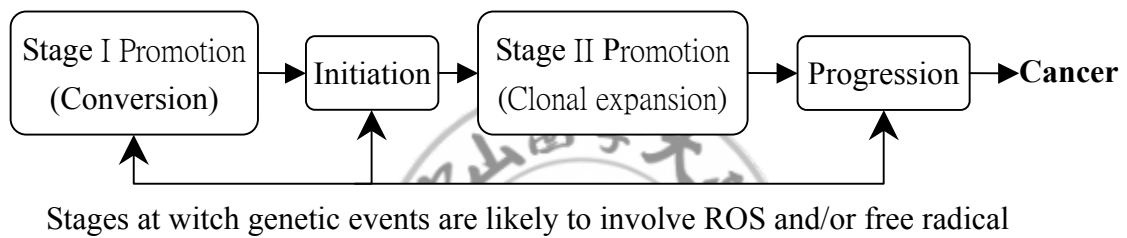
79. Lewis, J. G., and Adams, D. O. Early inflammatory changes in the skin of SENCAR and C57BL/6 mice following exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 1987, 8, 89-898.
80. Copeland, E. S. A national institutes of health workshop report. free radicals in promotion -- a chemical pathology study section workshop. *Cancer Res.* 1983, 43, 5631-5637.
81. Reiners, J. J., Pence, B. C., Barcus, M. C., and Cantu, A. R. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-dependent induction of xanthine dehydrogenase and conversion to xanthine oxidase in murine epidermis. *Cancer Res.* 1987, 47, 1775-1779.
82. Solanki, V., Rana, R. S., and Slaga, T. J. Diminution of mouse epidermal superoxide dismutase and catalase activities by tumor promoters. *Carcinogenesis* 1981, 2, 1141-1146.
83. Reiners, J. J., Thai, G., Pavone, A., Rupp, T., Kodari, E. Modulation of catalase activities in murine epidermal cells as a function of differentiation and exposure to 12-O- tradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 1990, 11, 957-963.

捌. 附圖

A.



B.



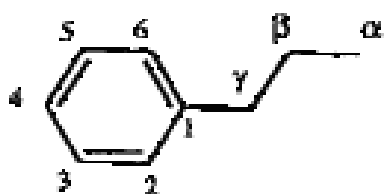
附圖一、Simplified model of multi-stage carcinogenesis

Arrows point to stages at which genetic events are likely to involve ROS and/or free radical.

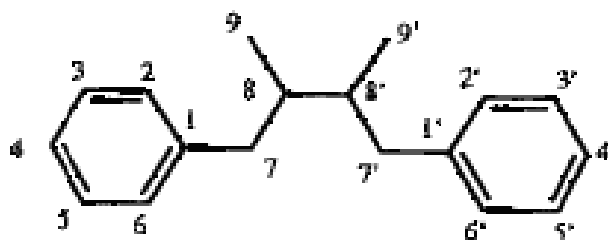


附圖二、食菜萆及木質莖部

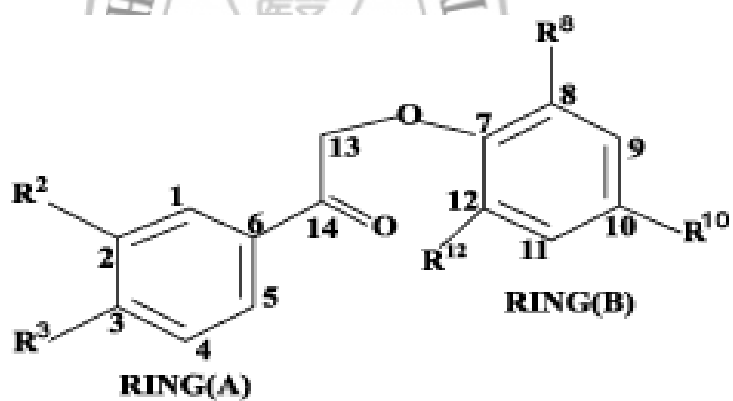
(a)



(b)

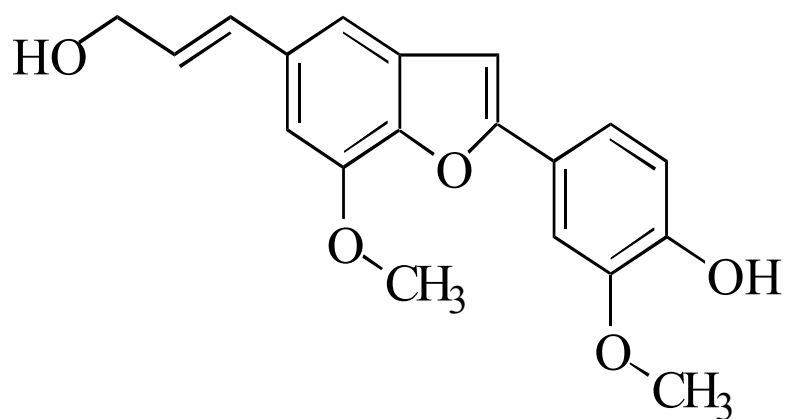


(c)



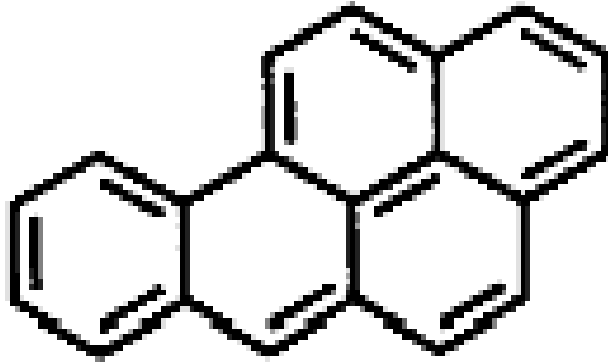
附圖三、Structure of the Lignane and neolignan

If the two C_6C_3 units (a) are linked by a β,β' -bond the parent structure lignane (b) is used as the basis for naming the lignan. (c) neolignan



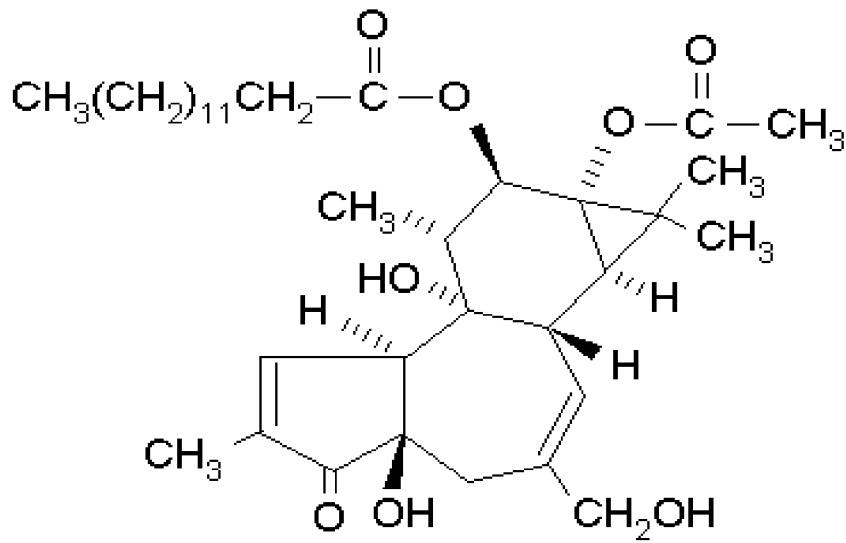
附圖四、Structure of the Ailanthoidol(AT)





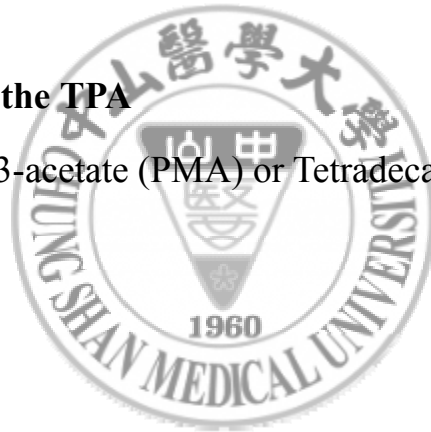
附圖五、Structure of the Benzo[a]pyrene $C_{20}H_{12}$

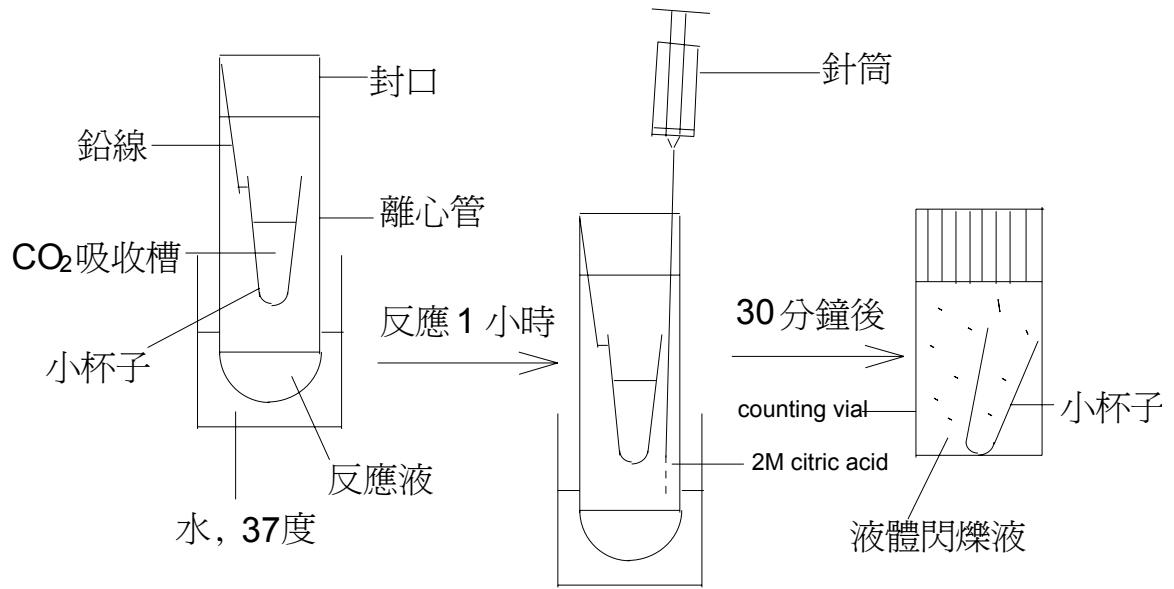




附圖六、Structure of the TPA

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) or Tetradecanoylphorbol Acetate (TPA).





附圖七、The bio-reactor of ODC activity assay

